

**Avaliação do comportamento e da influência de diferentes estirpes
não-convencionais em processo de co-fermentação com
Saccharomyces em diversos estilos de cervejas.**

Nádia Andreia Bravo de Figueiredo

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Alimentar

Orientador: Catarina Paula Guerra Geoffroy Prista

Júri:

Presidente: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar com
Agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Vogais: Doutor Manuel José de Carvalho Pimenta Malfeito Ferreira, Professor
Auxiliar com Agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade
de Lisboa

Doutora Catarina Paula Guerra Geoffroy Prista, Professora Auxiliar do
Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Lisboa, 2018

Agradecimentos

O presente trabalho, apesar de individual, não teria sido possível se não fosse o contributo de inúmeras pessoas ao longo de todo o seu processo de realização.

Em primeiro lugar, os meus sinceros agradecimentos à Professora Catarina Prista por todo o apoio e disponibilidade prestada ao longo da elaboração desta dissertação.

Desejo igualmente agradecer, por todo o apoio, a todas as técnicas do Laboratório de Microbiologia que me auxiliaram numa grande parte da componente prática deste trabalho. Assim como à Rafaela Santos por todo o carinho, paciência e amizade que teve para comigo.

Não posso deixar de agradecer também a todos aqueles que, de alguma forma, estiveram comigo ao longo de toda esta aventura. Em especial ao cervejeiro João Birra, por todos os ensinamentos e muita paciência que teve comigo durante todo este tempo.

E ainda à minha amiga Daniela Agostinho pelo companheirismo ao longo de todos estes anos, assim como à Joana Martins e Joana Prado pela paciência e carinho.

Aos meus *Homes*, e restantes meninas da *Tunassa*, muito obrigada pelo vosso apoio, amizade, e por me terem proporcionado os melhores 5 anos da minha vida.

À minha melhor amiga Ana Patrícia, muito obrigada por teres estado sempre a meu lado nos bons e maus momentos, sem ti, tenho a certeza que o caminho teria sido muito mais atribulado.

Por último à minha família, em especial aos meus pais e irmão, pela paciência incansável, compreensão, por me ajudarem sempre a ver o lado positivo e a ultrapassar todos os desafios.

Resumo

A cerveja é uma bebida que se encontra em crescente desenvolvimento, a par do aumento da exigência dos seus consumidores e a necessidade de diferenciação e modernização por parte dos produtores.

O principal objetivo desta dissertação centra-se no desenvolvimento de novas cervejas através da combinação de estirpes não-convencionais de co-fermentação com *Saccharomyces* em diferentes estilos de cerveja, tendo sido analisado o comportamento metabólico de diferentes espécies e o seu contributo para o perfil sensorial do produto final.

Foram selecionadas três espécies não-*Saccharomyces*: *Pichia kluyveri*, *Metschnikowia pulcherrima* e *Saccharomycodes ludwigii*, e as estirpes comerciais correspondentes a cada estilo: *S. cerevisiae* Safale S-04 (*Stout*), *S. cerevisiae* Blanche (*Weissbier*) e *S. cerevisiae* Saflager S-23 (*Dunkel*). O comportamento das estirpes foi avaliado, ao longo do processo fermentativo, com base em parâmetros microbiológicos e físico-químicos, assim como o seu impacto no perfil sensorial de cada cerveja maturada.

Para as co-fermentações com as três estirpes não-convencionais verificou-se que ao longo do processo ocorreu um aumento do número de células metabolicamente ativas, com o número de células viáveis a variar entre 10^5 - 10^6 UFC/mL (*Weissbier*) e 10^7 UFC/mL (*Stout* e *Dunkel*). Simultaneamente, o consumo de açúcares ocorreu de forma gradual e sequencial, com a glucose a atingir o esgotamento ao fim de 2-5 dias, ao passo que a maltotriose só foi esgotada nos ensaios inoculados em mosto *Dunkel* e ao fim de 6 dias. Comparando o efeito das estirpes não-convencionais os resultados indicaram que *S. ludwigii* foi a estirpe que fermentou mais eficientemente que a glucose quer a maltose. Os produtos de fermentação refletem o consumo de açúcares, verificando-se que os ensaios que apresentaram maior concentração de etanol são aqueles onde o consumo de açúcares foi mais eficiente.

Ao nível da análise sensorial os ensaios em mosto de *Weissbier* foram aqueles que mais se aproximaram do esperado.

Palavras-chave: cerveja, co-fermentação, comportamento metabólico, *Saccharomyces*, leveduras não-convencionais.

Abstract

The interest for new beers is growing, in tight connexion with the increasing demand of its consumers. For this reason, brewer's producers have been working towards differentiation and modernization of beer.

The main objective of the present work is the development of new beers by combining non-conventional species of yeast in a process of co-fermentation with *Saccharomyces* using different styles of beer. The trials were evaluated regarding the metabolic behavior of different species, and the contribution of the sensory profile of the beers.

With these objectives, we selected three non-*Saccharomyces* species: *Pichia kluyveri*, *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces ludwigii*, as well as the commercial strains corresponding to each beer style *S. cerevisiae* Safale S-04 (*Stout*), *S. cerevisiae* Blanche (*Weissbier*) and *S. cerevisiae* Saflager S-23 (*Dunkel*).

The behavior of the strains was evaluated throughout the fermentation process, based on microbiological and physicochemical parameters. For each mature beer, the impact of non-conventional yeasts on their sensory profile was also evaluated.

The number of metabolically active cells increased along the co-fermentation with the non-conventional yeasts, between 10^5 - 10^6 CFU/mL (*Weissbier*) and 10^7 CFU/mL (*Stout* and *Dunkel*) at the end of fermentation. Simultaneously, sugar was gradually and sequentially consumed. The glucose was exhausted after 2-5 days, followed by maltose. Maltotriose was only completely consumed after 6 days and just on *Dunkel* wort. Among the three non-conventional yeast, *S. ludwigii* was the strain that fermented more efficiently both glucose and maltose. The fermentation products reflect the consumption of sugars, the highest concentration of ethanol are those where the consumption of sugars corresponding to the most efficient sugar consumption.

The mature beers presented different sensorial characteristics, reflecting the influence exerted by the unconventional strains. The trials inoculated on *Weissbier* wort were those that were closer to the desired.

Keywords: beer, co-fermentation, metabolic behavior, *Saccharomyces*, non-conventional species.

Índice

AGRADECIMENTOS	I
RESUMO	III
ABSTRACT	IV
ÍNDICE	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE TABELAS	IX
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	X
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. CERVEJA	2
1.1.1. <i>Enquadramento histórico e cultural da cerveja</i>	2
1.1.2. <i>Evolução do mercado da cerveja em Portugal</i>	3
1.1.3. <i>Os diferentes estilos de cerveja</i>	4
1.1.4. <i>Matérias primas utilizadas na produção de cerveja</i>	5
1.2. PROCESSO PRODUTIVO	9
1.2.1. <i>Esquema geral de produção</i>	9
1.2.2. <i>Brassagem</i>	9
1.2.3. <i>Fermentação</i>	12
1.2.4. <i>Maturação</i>	16
1.3. CARACTERIZAÇÃO DAS LEVEDURAS INTERVENIENTES NA PRODUÇÃO DE CERVEJA	17
1.3.1. <i>Género Saccharomyces</i>	18
1.3.2. <i>Género Não-Saccharomyces</i>	19
1.3.3. <i>Outras leveduras não convencionais</i>	21
1.4. CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS DAS CERVEJAS	22
2. MATERIAIS E MÉTODOS	23
2.1. ESTIRPES DE LEVEDURAS, CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO E MANUTENÇÃO DAS CULTURAS ..	23
2.2. ENSAIOS FERMENTATIVOS	23
2.2.1. <i>Matérias-primas utilizadas</i>	23
2.2.2. <i>Processo produtivo</i>	24
2.2.3. <i>Fermentação do mosto</i>	24
2.2.4. <i>Engarrafamento e maturação</i>	25
2.3. ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	25
2.3.1. <i>Determinação do número de células viáveis</i>	25
2.3.2. <i>Determinação do número de células cultiváveis</i>	26
2.3.3. <i>Determinação da turvação</i>	26
2.3.4. <i>Determinação da proteína</i>	26
2.4. ANÁLISES DOS PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS	26
2.4.1. <i>Determinação do pH</i>	26

2.4.2.	<i>Determinação da densidade</i>	27
2.4.3.	<i>Determinação °Brix</i>	27
2.4.4.	<i>Determinação dos açúcares redutores (Keto-Diabur-Test 5000)</i>	27
2.4.5.	<i>Determinação dos açúcares, etanol, glucose e ácidos orgânicos (HPLC)</i>	27
2.4.6.	<i>Análise sensorial</i>	28
2.4.7.	<i>Análise estatística</i>	28
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
3.1.	CARACTERIZAÇÃO DAS ESTIRPES SELECIONADAS	29
3.2.	CARACTERIZAÇÃO DOS ESTILOS DE CERVEJAS	30
3.3.	ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO COM MOSTO TIPO <i>DUNKEL</i>	31
3.3.1.	<i>Análise Microbiológica</i>	31
3.3.2.	<i>Análise dos parâmetros físicos e químicos</i>	36
3.4.	ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO COM MOSTO TIPO <i>WEISSBIER</i>	41
3.4.1.	<i>Análise Microbiológica</i>	41
3.4.2.	<i>Análise dos parâmetros físicos e químicos</i>	44
3.5.	ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO COM MOSTO TIPO <i>STOUT</i>	49
3.5.1.	<i>Análise Microbiológica</i>	49
3.5.2.	<i>Análise dos parâmetros físicos e químicos</i>	53
3.6.	CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS FINAIS EM MOSTO <i>DUNKEL</i> , <i>WEISSBIER</i> E <i>STOUT</i>	57
3.6.1.	<i>Análise Microbiológica da cerveja após o período de maturação</i>	58
3.6.2.	<i>Caracterização físico-química da cerveja após o período de maturação</i>	60
3.6.3.	<i>Análise Sensorial dos Produtos Finais</i>	62
3.7.	ANÁLISE GLOBAL COMPARATIVA DOS RESULTADOS.....	66
3.7.1.	<i>Parâmetros Microbiológicos e Físico-químicos</i>	67
3.7.2.	<i>Análise comparativa da evolução dos metabolitos de fermentação</i>	71
4.	CONCLUSÕES GERAIS	74
5.	BIBLIOGRAFIA	76
6.	CIBERGRAFIA.....	82
7.	ANEXOS	83
	ANEXO I - RECEITA-BASE E PROGRAMA DE BRASSAGEM	83
	ANEXO II – RETAS DE CALIBRAÇÃO DE HPCL	84
	ANEXO III – FICHA DE PROVA DE ANÁLISE SENSORIAL	85
	ANEXO IV –TABELAS RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS NOS ENSAIOS PARÂMETROS EM AVALIAÇÃO.	86

Índice de Figuras

Figura 1 – Diagrama do processo de fabrico de cerveja.....	9
Figura 2 - Esquema representativo da fermentação alcoólica..	13
Figura 3 - Interligação entre as diferentes vias metabólicas	14
Figura 4 - <i>S. cerevisiae</i>	19
Figura 5 - <i>S.pastorianus</i>	19
Figura 6 - <i>P. kluyveri</i>	20
Figura 7 – <i>M. pulcherrima</i>	20
Figura 8 – <i>S. ludwigii</i>	21
Figura 9 – Exemplos dos frascos Shott utilizados nos diferentes nos diferentes ensaios em mosto <i>Stout</i> (A) e <i>Dunkel</i> (B).	25
Figura 10 - Viabilidade das estirpes durante a fermentação em mosto <i>Dunkel</i>	32
Figura 11 - Evolução da turvação durante a fermentação nos diferentes ensaios em mosto <i>Dunkel</i> ..	33
Figura 12 – Aspeto microscópico das diferentes estirpes (ampliação 400x).....	34
Figura 13 - Evolução da concentração de proteína solúvel durante a fermentação nos diferentes ensaios em mosto <i>Dunkel</i>	35
Figura 14 – Evolução do pH durante a fermentação nos diferentes ensaios em mosto <i>Dunkel</i> ..	36
Figura 15 – Resultados do Teste Keto-Diabor 5000, nos diferentes tempos de fermentação para o ensaio com <i>S. cerevisiae</i> Saflager S-23.	37
Figura 16 - Evolução do °Brix durante a fermentação nos diferentes ensaios em mosto <i>Dunkel</i> ..	37
Figura 17 – Evolução da densidade durante a fermentação nos diferentes ensaios em mosto <i>Dunkel</i>	39
Figura 18 - Consumo de açúcares e de produção de etanol e glicerol ao longo da fermentação nos diferentes ensaios em mosto <i>Dunkel</i>	40
Figura 19- Viabilidade das estirpes durante a fermentação em mosto <i>Weissbier</i> ..	42
Figura 20 - Evolução da turvação durante a fermentação em mosto <i>Weissbier</i>	42
Figura 21 - Evolução da concentração de proteína solúvel nos diferentes ensaios durante a fermentação em mosto <i>Weissbier</i>	43
Figura 22 – Evolução do pH dos diferentes ensaios durante a fermentação em mosto <i>Weissbier</i>	45
Figura 23 - Exemplo de um resultado do Teste Keto-Diabor- 5000, realizado nos diferentes tempos de fermentação em mosto <i>Weissbier</i>	45
Figura 24 - Evolução do ° Brix nos diferentes ensaios durante a fermentação em mosto <i>Weissbier</i> ..	46
Figura 25 – Evolução da densidade nos diferentes ensaios durante a fermentação em mosto <i>Weissbier</i>	47

Figura 26 - Consumo de açúcares e de produção de etanol, e glicerol, ao longo da fermentação nos diferentes ensaios em mosto <i>Weissbier</i>	48
Figura 27- Viabilidade das estirpes durante a fermentação em mosto <i>Stout</i>	50
Figura 28 - Evolução da turvação dos diferentes ensaios durante a fermentação em mosto <i>Stout</i>	51
Figura 29 - Evolução da concentração de proteína solúvel nos diferentes ensaios durante a fermentação em mosto <i>Stout</i>	52
Figura 30 - Evolução do pH dos diferentes ensaios durante a fermentação em mosto <i>Stout</i>	53
Figura 31 - Resultado do Teste Keto-Diabur- 5000, nos diferentes tempos de fermentação no ensaio com <i>S. cerevisiae</i> S-04 em mosto <i>Stout</i>	54
Figura 32 - Evolução do °Brix nos diferentes ensaios durante a fermentação em mosto <i>Stout</i> ...	54
Figura 33 – Evolução da densidade nos diferentes ensaios durante a fermentação em mosto <i>Stout</i>	55
Figura 34 - Consumo de açúcares e de produção de etanol, e glicerol, ao longo da fermentação nos diferentes ensaios em mosto <i>Stout</i>	56
Figura 35 – Produtos finais obtidos em mosto <i>Dunkel</i>	63
Figura 36 – Produtos finais obtidos em mosto <i>Weissbier</i>	64
Figura 37 – Produtos finais obtidos em mosto <i>Stout</i>	65
Figura 38- Viabilidade das diferentes estirpes quando inoculadas nos três mostos.....	67
Figura 39 - Variação da turvação registada nos ensaios inoculados com as diferentes estirpes.....	68
Figura 40- Variação da concentração de proteína solúvel registada nos ensaios inoculados com as diferentes estirpes.....	69
Figura 41 - Variação dos valores de pH e °Brix registada nos ensaios inoculados com as diferentes estirpes.....	70
Figura 42 - Variação dos valores de densidade registada nos ensaios inoculados com as diferentes estirpes.....	70
Figura 43- Variação da concentração dos metabolitos de fermentação registados nos ensaios inoculados com as diferentes estirpes.....	71
Figura 44- Variação da concentração de glicerol e etanol registados nos ensaios inoculados com as diferentes estirpes.....	72
Figura 47 - Curvas de calibração de HPLC, dos diferentes açúcares - maltose, maltotriose e glucose, assim como do glicerol e do etanol.....	84

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Diferentes estilos de Cerveja	5
Tabela 2 - Principais enzimas envolvidas no processo de empastagem..	11
Tabela 3 – Ésteres da cerveja, e respetivos descritores	15
Tabela 4 - Características que distinguem os diferentes tipos de leveduras empregues no processo cervejeiro.	18
Tabela 5– Estirpes de leveduras utilizadas.....	23
Tabela 6 – Caracterização das diferentes estirpes selecionadas, com base na capacidade de crescimento em diferentes meios.....	30
Tabela 7 – Caracterização dos mostos utilizados nos diferentes ensaios.	31
Tabela 8 –Concentração de proteína no início e fim da fermentação em mosto <i>Dunkel</i>	35
Tabela 9 – Relação entre os valores de pH, no início e fim da fermentação em mosto <i>Dunkel</i>	36
Tabela 10 – Turvação observada no início e fim da fermentação em mosto <i>Stout</i>	51
Tabela 11 –Concentração de proteína no início e fim da fermentação em mosto <i>Stout</i>	52
Tabela 12 – Relação entre os valores de pH, no início e fim da fermentação em mosto <i>Stout</i>	53
Tabela 13 – ° Brix no início e fim da fermentação em mosto <i>Stout</i>	54
Tabela 14 – Turvação no final da fermentação e no período após o período de maturação, realizados em mosto <i>Dunkel</i> , <i>Weissbier</i> e <i>Stout</i>	59
Tabela 15 – Concentração de proteína no final da fermentação e no período após o período de maturação, realizados em mosto <i>Dunkel</i> , <i>Weissbier</i> e <i>Stout</i>	60
Tabela 16 – pH no final da fermentação e no período após o período de maturação, realizados em mosto <i>Dunkel</i> , <i>Weissbier</i> e <i>Stout</i>	61
Tabela 17 – Concentração de glicerol e etanol obtidos no final da fermentação e no período após o período de maturação, realizados em mosto de <i>Dunkel</i>	61
Tabela 18– Concentração de glicerol e etanol obtidos no final da fermentação e no período após o período de maturação, realizados em mosto de <i>Weissbier</i>	61
Tabela 19– Concentração de glicerol e etanol obtidos no final da fermentação e no período após o período de maturação, realizados em mosto de <i>Stout</i>	62
Tabela 20– Relação entre os compostos orgânicos e os diferentes <i>flavours</i> dos ensaios em mosto <i>Dunkel</i>	63
Tabela 21 – Relação entre os compostos orgânicos e os diferentes <i>flavours</i> dos ensaios em mosto <i>Weissbier</i>	65
Tabela 22 – Relação entre os compostos orgânicos e os diferentes <i>flavours</i> dos ensaios em mosto <i>Stout</i>	66
Tabela 23 - Receita e programa de brassagem do mosto <i>Stout</i>	83
Tabela 24 - Receita e programa de brassagem do mosto <i>Dunkel</i>	83
Tabela 25 - Receita e programa de brassagem do mosto <i>Weissbier</i>	83
Tabela 26 - Resumo dos resultados obtidos no início da fermentação	86
Tabela 27 - Resumo dos resultados obtidos no momento da co-inoculação	87
Tabela 28 - Resumo dos resultados obtidos no momento final da fermentação da co-inoculação	87
Tabela 29 - Resumo dos resultados obtidos no produto final.....	87

Lista de siglas e abreviaturas

a.C. – Antes de Cristo

ATP – Adenosina tri-fosfato

d.C. – Depois de Cristo

DO – Densidade Ótica

°Brix – grau brix

g – força gravítica

(m/v) – massa por volume

NAD – Dinucleótido de nicotinamida e adenina

(v/v) – Volume por volume

rpm – Rotações por minuto

SCC – Sociedade Central de Cervejas

UFC – Unidade Formadora de Colónias

YPD – Extrato de Levedura Peptona Dextrose

μ_c – taxa específica de crescimento

1. Introdução

A cerveja é uma bebida fermentada maioritariamente composta por água, cereais maltados, lúpulo e leveduras, cuja produção consiste num complexo conjunto de processos e reações químicas. O seu processo produtivo tem como etapa inicial a maltagem, seguindo-se a brassagem, fermentação e por último a maturação, processo que permite a estabilização das características sensoriais do produto final.

No panorama cervejeiro, nacional e internacional, a cerveja artesanal está a ganhar cada vez mais importância e aposta cada vez mais no melhoramento das técnicas. Esta evolução tem promovido uma maior modernização e diferenciação dos produtos, com o intuito de despertar o interesse dos consumidores e satisfazer as suas necessidades. Uma das vertentes de desenvolvimento deste produto é a introdução de novas espécies e estirpes de leveduras no processo produtivo.

As leveduras utilizadas tradicionalmente na produção de cerveja são do género *Saccharomyces*, que apesar da sua influência positiva no que respeita a consistência e eficiência do processo, apresentam algumas limitações no seu potencial como agentes de produção de *flavour* em particular no caso das estirpes usadas em cervejas de tipo *Lager*. De forma a compensar essa limitação, têm vindo a ser realizados estudos que comprovam que a incorporação de espécies não-*Saccharomyces* no processo produtivo de cerveja contribui para o desenvolvimento de novas características sensoriais no produto final (Kántor *et al.*, 2015; Michel *et al.*, 2016; Quirós *et al.*, 2014; Steensels e Verstrepen, 2014). Estas leveduras não-*Saccharomyces* encontram-se ainda associadas à produção de cervejas com baixo teor alcoólico mas apresentam maior suscetibilidade a stress abióticos (Basso *et al.*, 2016).

O presente trabalho foi desenvolvido como continuação do projeto desenvolvido por Garcia (2017), e por essa razão, foram vários os pressupostos definidos a partir desse mesmo trabalho, entre eles, a seleção dos mostos utilizados, nomeadamente do tipo *Stout*, *Weissbier* e *Dunkel*, que correspondem a estilos de cerveja populares do tipo *Ale* e *Lager*. A seleção das estirpes não-convencionais, teve por base diferentes estudos previamente desenvolvidos sobre o potencial fermentativo, tendo sido selecionadas as estirpes *Pichia kluyveri*, *Metschnikowia pulcherrima* e *Saccharomycodes ludwigii*. Por sua vez, foram selecionadas as estirpes comerciais correspondentes a cada estilo de cerveja, nomeadamente *S. cerevisiae* Safale S-04 (*Stout*), *S. cerevisiae* Blanche (*Weissbier*) e *S. cerevisiae* Saflager S-23 (*Dunkel*).

Neste sentido, a presente dissertação apresenta como principal objetivo o estudo do comportamento metabólico das diferentes estirpes não convencionais, quando inoculadas em diferentes estilos de cerveja em processo de co-fermentação com estirpes comerciais. Outro dos objetivos, centra-se na avaliação da influência das diferentes estirpes no perfil sensorial das cervejas resultantes, quer em termos do contributo individual de cada estirpe, quer da versatilidade das mesmas nos diferentes estilos selecionados.

Os ensaios fermentativos foram realizados em duplicado, em paralelo com um ensaio controlo inoculado apenas com estirpes comerciais de *Saccharomyces*, para cada estilo de cerveja. Ao longo de todo o processo fermentativo, o comportamento das estirpes foi avaliado ao nível dos parâmetros microbiológicos (evolução células totais e viáveis), dos parâmetros físicos e químicos (turvação, concentração de proteína solúvel, pH, °Brix, concentração de açúcares, concentração dos produtos de fermentação etanol e glicerol). Posteriormente, no final da maturação foi avaliado o impacto das leveduras não-convencionais no perfil sensorial do produto final.

1.1. Cerveja

O termo “cerveja” é atualmente associado a uma vasta gama de bebidas que diferem entre si na aparência, *flavour* e até mesmo na variedade de matérias primas utilizadas (Boulton e Quain, 2001). No entanto, pode ser definida como sendo uma bebida aquosa fermentada à base de amido e aromatizada com lúpulo (De Keukeleirc, 2000).

Atendendo à Portaria nº1/96 de 3 de Janeiro, a cerveja é definida como uma bebida obtida pela ação fermentativa de leveduras selecionadas do género *Saccharomyces*. O mosto, elemento intermédio da sua produção, deve ser preparado a partir de malte de cereais e outras matérias-primas amiláceas ou açucaradas, ao qual são adicionadas flores de lúpulo ou seus derivados e água potável. Por sua vez, o álcool deve resultar exclusivamente da fermentação dos açúcares presentes no mosto.

1.1.1. Enquadramento histórico e cultural da cerveja

A produção de cerveja faz parte da atividade Humana desde os primórdios da civilização (Arthur, 2014), tendo surgido simultaneamente com a disseminação da agricultura e o desenvolvimento da roda no quinto milénio a.C., factos estes comprovados por evidências arqueológicas (Hornsey, 2003). Acredita-se que a sua descoberta tenha ocorrido de forma accidental fruto da fermentação não induzida de cereais (Buchanan e Doyle, 2007).

No primeiro milénio d.C. dá-se a introdução de um novo ingrediente, o lúpulo. A sua utilização torna-se viral por toda a europa, consequência do seu poder antisséptico e por conferir à cerveja um sabor amargo (Invernizzi, 2016).

A “bebida divina” do povo Egípcio surge em regiões agrícolas onde o cultivo de vinhas não era suportado pelas terras, recorrendo-se portanto à produção e consumo de produtos derivados da fermentação dos cereais (Cabras e Higgins, 2016). Esta bebida era também apreciada entre os gregos e romanos, principalmente devido às suas propriedades medicinais.

No período 500 a.C., que corresponde ao auge das Civilizações Clássicas da Grécia e Roma, o consumo de vinho aumentou, tornando-se esta a bebida preferida pelas classes sociais superiores, à exceção dos povos Celtas e Germânicos que continuaram a idolatrar o consumo de cerveja (Meussdoerffer, 2009).

Com a queda do Império Romano, coube à Igreja Católica recuperar e conservar alguns dos conhecimentos médicos, científicos e técnicos que se perderam com a entrada na Idade Média. A produção de cerveja passou de uma tradição familiar para uma prática, realizada em mosteiros e conventos, contribuindo assim para a conservação do conhecimento e para o desenvolvimento das técnicas de fabrico da mesma (Unger, 2007).

Em 1516, face ao uso negligente de vários tipos de cereais, que por vezes não se encontravam nas melhores condições de consumo, estabeleceu-se na Alemanha a *Reinheitsgebot* – Lei da pureza, que obrigava todos os produtores de cerveja a utilizar como matéria prima apenas água, lúpulo e malte de cevada. A *weizen beer* distinguia-se como sendo a única exceção dado que na sua produção era utilizado também o malte de trigo. Qualquer outro tipo de cerveja produzido era considerado ilegal (German Brewers' Association, 2017).

Na segunda metade do século XIX Luis Pasteur concentrou os seus estudos na compreensão do processo fermentativo, tornando-se assim responsável pela atribuição da fermentação alcoólica à ação das leveduras (Fleet, 1993), assim como pela criação de um método eficaz – a Pasteurização, com vista a impedir a evolução de fermentações indesejadas na produção de cerveja. Este processo consiste no aumento da temperatura das garrafas a valores que podem variar entre os 55° C e os 60° C, durante um mínimo de 15 minutos (Stumbo, 1973).

Mais recentemente, novas inovações biotecnológicas permitiram o aumento da *shelf-life* dos produtos e conduziram a um aumento do consumo de cerveja por todo o mundo. No sentido de minimizar as alterações que ocorrem no período de armazenamento, recorre-se a mecanismos que conduzam à estabilização do produto final, por exemplo através da remoção de proteínas por absorção em gel de sílica, por adição de enzimas proteolíticas evitando a polimerização de proteínas, e ainda com recurso a adsorventes de PVPP (Briggs *et al.*, 2004; Stewart, 2006).

1.1.2. Evolução do mercado da cerveja em Portugal

Em Portugal, o consumo de cerveja está associado a uma tradição bem vincada. A sua comercialização inicia-se em 1680, sendo a região do Porto responsável pelo desenvolvimento desta indústria. Por volta de 1920, o mercado cervejeiro português era abastecido por seis empresas: a Portugália, a Estrela, a Companhia União Fabril Portuense, a Companhia da Fábrica de Cerveja Jansen, a Companhia de Cervejas de Coimbra e a Fábrica de Cervejas Trindade. Uma década depois é formada a Sociedade Central de Cervejas (SSC) com o fim de comercializar as cervejas produzidas pelas fábricas situadas no centro do país (APPC, 2012).

A marca Sagres surge em 1940 a par com a realização da Exposição do Mundo Português, seguida do lançamento de uma marca de luxo no ano seguinte – a Imperial, que ainda hoje é associada a cerveja de barril servida a copo. Em 1977, surge a Centralcer, consequência da fusão entre a Sociedade Central de Cervejas e a Cergal – Cervejas de Portugal, que mais tarde em 2008, vem a ser adquirida pelo grupo Heineken.

A grande concorrente da Central de Cervejas é a Unicer, cujas origens remetem para o movimento dos industriais cervejeiros do Porto que fundaram a Companhia União Fabril Portuense das Fábricas de Cerveja e Bebidas Refrigerantes (CUFP), em 1890.

Em Portugal, no ano de 2010, os indivíduos com idade superior a 15 anos consumiam em média 12,9 litros de álcool puro por ano, correspondendo a um consumo diário de 28g de álcool puro por pessoa. A cerveja representava então 31% do consumo registado no país, sendo este liderado pelo vinho com 55% (SICAD, 2016).

Dados mais recentes indicam que a indústria das bebidas faturou, em 2015, cerca de 2,5 mil milhões de euros, sendo que a “fabricação de cerveja” equivalia a 24,3% (25,8% em 2014). Entre 2014 e 2015, a produção de cerveja diminuiu, no entanto continuou a ser a bebida alcoólica com maior quantidade disponível para consumo. Em 2016, corresponde a 50,5% das quantidades totais disponíveis para consumo das bebidas alcoólicas (139,5 mL/hab/dia) (Balança Alimentar Portuguesa, 2017).

Por outro lado, o mercado das cervejas artesanais em Portugal tem crescido de forma exponencial desde 2011/12, no seguimento do movimento *craft beer* iniciado na Irlanda em 1971. Estima-se que à data de 2 de Janeiro de 2017 existiam cerca de 115 marcas de cerveja artesanal em Portugal, variando entre distribuição nacional ou apenas local (Cerveja Artesanal Portuguesa, 2017).

1.1.3. Os diferentes estilos de cerveja

Com o avançar dos tempos e o melhoramento das técnicas cervejeiras os produtores apostam cada vez mais na modernização e diferenciação dos seus produtos, tornando a classificação das cervejas um motivo de debate. Existem diversas formas de classificar este produto tendo em conta critérios como a natureza das matérias primas, o tipo de agente microbiano utilizado na fermentação, assim como as suas características físico-químicas e sensoriais (Boulton e Quain, 2001; Briggs *et al.*, 2004).

Relativamente ao tipo de agente microbiano, recorre-se frequentemente à distinção entre cervejas com base no tipo de levedura inoculada durante o processo produtivo, existindo dois grandes grupos distintos: *Ales* e *Lagers*. Existe ainda uma terceira classe, as cervejas *Lambics* que são produzidas por fermentações espontâneas, sem adição direta de leveduras. Na Tabela 1 é apresentada uma lista de alguns dos estilos de cerveja mais populares.

Tabela 1 – Diferentes estilos de Cerveja. Adaptado de (Boulton e Quain, 2001).

Estilo cerveja	Origem	Tipo de fermentação	ABV	Descrição
<i>Bitter Ale</i>	Reino Unido	Alta	3,5 - 5,5	Sensorial: pouco amarga e com pouco gás. Cor: varia do amarelo-dourado ao âmbar.
<i>India Pale Ale</i>	Reino Unido	Alta	5,5 - 7,5	Sensorial: componente de lúpulo acentuado Cor: varia entre o amarelo dourado e o acobreado.
<i>Weizen</i>	Bavaria, Alemanha	Alta	5 - 5,5	Cerveja de trigo Sensorial: ligeiramente lupulada e gosto fenólico
<i>Porter</i>	Londres, Reino Unido	Alta	6 - 7	Feita com água londrina, composição alta em bicarbonato. Cor: ruby
<i>Stout</i>	Reino Unido	Alta	4 - 5	Sensorial: com notas a café, cacau ou cereais torrados, muito lupulada. Cor: Muito escura
<i>Trappist</i>	Abadias Belgas e Holandesas	Alta	5 - 12	Sensorial: diferentes intensidades aromáticas. Cor: varia entre o âmbar e castanha.
<i>Bock</i>	Einbeck, Alemanha	Baixa	5,5 - 7,5	Sensorial: ligeiramente lupulada. Cor: castanho escuro forte
<i>Dortmunder Helles</i>	Vestfália, Alemanha	Baixa	5 - 5,6	Versão mais pálida da <i>Dunkel</i> Sensorial: menos lupulada que as <i>Pilsner</i> . Cor: dourada
<i>Dunkel</i>	Munique, Bavaria, Alemanha	Baixa	4,4 - 5	Cervejas suaves, ricas e complexas. Sensorial: doce, notas a cacau ou chocolate. Teor amargo é medio-baixo. Cor: vai do cobre ao castanho escuro.
<i>Pilsner</i>	Boémia, República Checa	Baixa	4 - 5,5	Abreviatura – Pils Sensorial: muito lupulado Cor: pálidas, amarelas
<i>Gueze</i>	Bruxelas, Bélgica	Refermenta em garrafa	5 - 5,5	Mistura de <i>lambics</i> novas e envelhecidas. Sensorial: seca e frutada
<i>Lambic</i>	Bruxelas, Bélgica	Espontânea	5 - 6,5	Cerveja azeda.

1.1.4. Matérias primas utilizadas na produção de cerveja

1.1.4.1. Água

A cerveja apresenta na sua composição entre 91 a 98% de água (Briggs *et al.*, 2004), sendo esta um dos seus principais constituintes.

Para além de intervir diretamente nas etapas produtivas, a água é essencial no processo de aquecimento, na produção de vapor, no arrefecimento dos sistemas e nos processos de limpeza.

No processo de fabrico de cerveja, a qualidade e composição da água devem ser tidas em conta uma vez que influenciam a formação do mosto. A sua composição iónica deve ser equilibrada, dado que esta contribui para a nutrição das leveduras, condiciona a conversão do amido e tem impacto no *flavour* da cerveja (Boulton e Quain, 2001; Palmer, 2006).

Os padrões de água potável em vigor estão definidos pela Regulamentação Europeia. No entanto, é essencial atender ao tipo de água adequada ao processo e à composição dos materiais que irão

estar em contacto com a mesma, sendo que estes podem sofrer deteriorações e corrosões (Bamforth, 2006). Independentemente da etapa em que é utilizada, a água deve ser insípida, inodora, pura e livre de substâncias e organismos que possam influenciar a qualidade da cerveja (Briggs *et al.*, 2004).

Fazem parte da composição da água iões como cálcio, magnésio, sódio, potássio, sulfato, fosfato, cloreto, carbonato, nitritos e em menor concentração, zinco, cobre e ferro (Goldammer, 2008). O cálcio representa um dos iões mais importantes na constituição da água. Este, durante a etapa de brassagem, reage com os iões fosfato, presentes no malte, influenciando, assim, o valor de pH do produto final. O valor de pH ótimo para a ação das leveduras varia entre $5,2 \pm 5,4$ (Bamforth, 2006).

Variações ao nível da composição da água determinam ainda o fabrico de diferentes tipos de cerveja. Enquanto águas duras (ricas em minerais) são adequadas para a produção de *Pale ales*, águas moles (pobres em minerais) são favoráveis à produção de *Stouts* (Palmer, 2006).

1.1.4.2. Leveduras

No processo de produção de cerveja a presença de leveduras é indispensável dada a sua capacidade fermentativa, sendo este consequentemente responsável pela conversão dos açúcares em álcool e dióxido de carbono.

A escolha das leveduras é determinada de acordo com a sua taxa de crescimento e a taxa de fermentação (Briggs *et al.*, 2004), assim como, dos objetivos que se pretendem atingir a nível do *flavour* e aroma do produto final. É possível então obter três grandes grupos de cervejas.

As *ales*, obtidas a partir da ação de estirpes de *Saccharomyces cerevisiae*, levedura de alta fermentação, cuja temperatura ideal de fermentação encontra-se entre 18-24° C (Callejo *et al.*, 2017). Durante a fermentação esta estirpe forma uma película espessa na superfície do fermentador, impedindo a libertação de dióxido de carbono. Para além disso, apresentam capacidade de formar grandes quantidades de ésteres que produzem o perfil sensorial distintivo de cervejas, como cervejas *porters*, *stouts*, e cervejas de trigo (Lettisha *et al.*, 2013).

As *lagers*, que surgem da utilização de estirpes de *Saccharomyces pastorianus*, levedura de baixa fermentação, cuja ação ocorre idealmente a temperaturas entre 4-15° C (Callejo *et al.*, 2017). Ao contrário das leveduras de alta fermentação, este tipo de leveduras tem capacidade de fermentar melibiose (Vidgren, 2010), e possuem maior capacidade de floculação. Esta estirpe é associada a estilos de cerveja como *Pilsners*, *Dunkel*, *Dortmunders*, *Märzen* e *Bocks*, sendo o estilo mais consumido em Portugal.

E por último, as *lambics*, são produzidas a partir da exposição do mosto ao ar, permitindo o desenvolvimento de uma microbiota espontânea que é responsável pela fermentação, não existindo adição de levedura (Callejo *et al.*, 2017). Este tipo de cerveja apresenta uma microbiota variada composta por leveduras e bactérias.

Em suma, a influência das leveduras determina a qualidade final da cerveja. É fundamental a seleção do género, espécie e estirpe adaptada ao estilo de cerveja a produzir, garantir a viabilidade e a pureza das estirpes inoculadas, e ainda proporcionar as condições ideais para ocorrer a ação fermentativa (Boulton e Quain, 2001).

1.1.4.3. Lúpulo

O lúpulo (*Humulus Lupulus*) é uma trepadeira perene de origem europeia. As suas flores contêm resinas amargas e óleos essenciais, que são produzidos nas glândulas da flor do género feminino, podendo ser classificado como lúpulo de amargor ou lúpulo de aroma, com base na composição destas duas frações. Esta matéria prima pode ser adicionada no início ou durante da ebulição do mosto, e/ou durante a fermentação da cerveja.

A componente amarga característica no sabor da cerveja, é resultado da presença de ácidos alfa, que são insolúveis em água até sofrerem isomerização, durante o processo de ebulição. Quanto maior o tempo de fervura, maior a percentagem de isomerização e consequentemente, mais amarga será a cerveja final. Por outro lado, os óleos essenciais que integram a composição aromática deste produto são voláteis, acabando por se libertar em grande parte durante a fervura (Bamforth, 2006; Palmer, 2006).

Este componente, de uma forma geral é processado em *pellets* ou extrato de lúpulo, é considerado como o principal aditivo de aroma e paladar da cerveja promovendo a sua estabilização coloidal, clarificação e estabilização da espuma, atuando como agente de esterilização do mosto devido ao seu poder antisséptico, influenciando assim, diretamente a qualidade do produto final (De Keukeleirc, 2000).

1.1.4.4. Malte de cevada

A cevada (*Hordeum vulgare* ou *Hordeum distichon*) é um cereal da família das gramíneas que, a par do trigo, do milho e do arroz é amplamente utilizada na dieta humana e na alimentação animal.

Os grãos de cevada, maioritariamente compostos por hidratos de carbono (70-85%), apresentam na sua constituição 63% de amido, 10,5 a 11,5% de proteína, 2 a 4% de matéria inorgânica, 1,5 a 2% de lípidos, e outras substâncias em pequenas quantidades (1-2%) (Kunze, 2004). Numa perspetiva nutritiva, a cevada constitui uma fonte rica em componentes como fibra (14 – 24%), β -glucanos (4 – 9%), e ainda aminoácidos essenciais e lisina (0,5%) (Do et al., 2015).

Morfológicamente, o grão é constituído pela casca, que constitui a estrutura protetora, por uma camada de aleurona, responsável pela síntese e ativação de enzimas. O controlo do crescimento da planta é da responsabilidade do embrião, que por sua vez se encontra protegido pelo escutelo (Hughes e Baxter, 2001).

De forma a expor os grânulos de amido, presentes no interior do grão, à ação das enzimas, a cevada utilizada na produção de cerveja é sujeita ao processo prévio de maltagem. Este processo pode ser definido como a germinação controlada de cereais, com o objetivo de diminuir os β -glucanos presentes nas paredes celulares (Hughes e Baxter, 2001), aumentar a da proporção de

enzimas livres e solúveis, facilitar a extração do amido, bem como diminuir a presença de algumas proteínas insolúveis que dificultam a ação enzimática.

A maltagem consiste em três etapas, a molha, a germinação e a torra. A primeira etapa é designada por Molha e apresenta um papel fundamental na qualidade de produção de malte, uma vez que, estimula o metabolismo do embrião potenciando a germinação dos grãos de cevada. O grão é totalmente imerso em água, o que fornece uma correta oxigenação, sendo que, no final desta etapa os grãos encontram-se inchados (Hornsey, 2003).

O processo de Germinação corresponde à etapa seguinte, e é caracterizado pelo crescimento do embrião do grão, "que se manifesta através do crescimento das radículas na base do grão e da plúmula e a modificação simultânea do conteúdo do endosperma" (Martins, 2015; Eblinger, 2009; Guildo, 2013).

A terceira e última etapa é a fase de Torra, que apresenta implicações ao nível da diferenciação dos tipos de malte. Durante esta última etapa, os grãos são submetidos a temperaturas elevadas, com recurso a um torrador, promovendo em alguns casos a ocorrência de reações de *Maillard* (reações não enzimáticas que ocorrem entre açúcares e aminoácidos), caramelização de açúcares e degradação de proteínas, lípidos e compostos fenólicos (Government *et al.*, 2011). Este processo tem como principal objetivo acentuar a cor e o aroma de cada tipo de malte, ou seja, é o principal responsável pelo escurecimento do malte e pelas características sensoriais específicas (Coghe *et al.*, 2005).

A aplicação de diferentes binómios Tempo/Temperatura no processo de torra originam diferentes tipos de malte, como o Deslavado, *Pilsen*, Viena, Munique, Caramelo, Torrado e Preto. Na preparação da receita da cerveja é definido o/ou os tipos de extratos de malte a utilizar, sendo que essa decisão irá influenciar a cor, aroma e *flavour* do produto final. Para produzir produtos torrados, como o malte Caramelo ou malte Chocolate, estes são tostados em tambores rotativos a temperaturas até 225 °C durante 2 horas. Estes tipos de maltes são usados em diferentes concentrações (10-20% ou por vezes em concentrações superiores ou inferiores) em cervejas tipo *stouts* ou *porters*. Dependendo da sua concentração, estes maltes, irão fornecer uma cor mais ou menos intensa e sabores mais ou menos torrados e amargos na cerveja (Steiner *et al.*, 2011).

1.2. Processo Produtivo

1.2.1. Esquema geral de produção

As etapas do processo de produção de cerveja encontram-se esquematizadas na Figura 1.

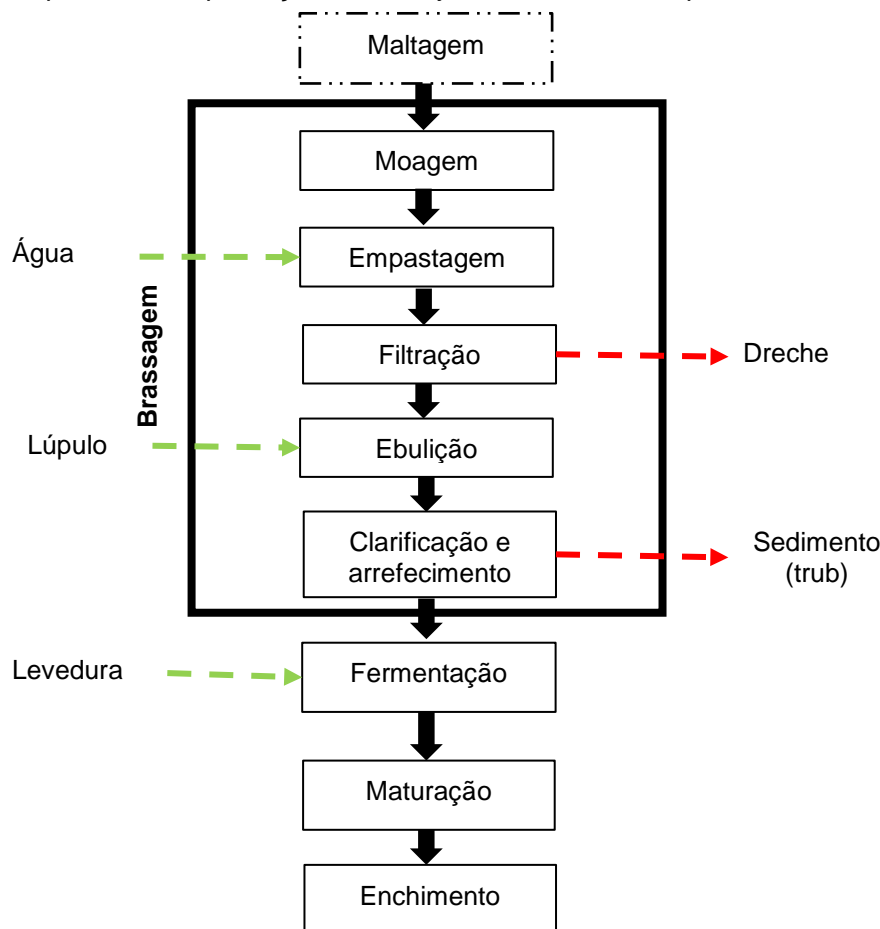


Figura 1 – Diagrama do processo de fabricação de cerveja. Adaptado de Lewis e Young (2002) e Palmer (2006).

Resumidamente, após a maltagem o malte e cereais não maltados sofrem um processo de moagem, seguido da adição de água (empastagem) que dá início às etapas de brassagem, durante a qual se vai aumentando a temperatura com vista a promover a ação de várias enzimas presentes no cereal, terminando com a etapa de ebulição onde ocorre a adição de lúpulo. Após a ebulição, o mosto é clarificado e arrefecido rapidamente e colocado no fermentador onde é inoculado com a estirpe desejada. No final da fermentação, obtém-se a “cerveja verde” que é maturada e engarrafada.

1.2.2. Brassagem

A brassagem corresponde a um conjunto de etapas tecnológicas, nomeadamente a moenda, empastagem, filtração, ebulição, clarificação e arrefecimento do mosto, tendo como principais objetivos a extração dos açúcares do malte, a quebra das ligações $\alpha(1-4)$ entre os monómeros de glucose e a definição das características do mosto.

Durante esta operação grupos de enzimas, compostos por α -amílases, β -amílases, endo- β 1,3:1,4glucanase e ainda proteases e carboxipeptidases, convertem as substâncias poliméricas presentes no mosto, amido, proteínas e β -glucanos, em compostos de peso molecular inferior. Esta ação influencia diretamente a eficácia da fermentação dos açúcares do mosto (Mousia *et al.*, 2004).

Moenda

A moenda tem como objetivo expor o conteúdo do endosperma à ação enzimática, de modo a facilitar a extração e conversão dos seus constituintes durante o processo de empastagem. No decorrer desta operação, o malte é moído até à granulometria desejada, normalmente por moinhos de rodas ou de martelos (Warpala e Pandiella, 2000). Quanto menor for a granulometria do malte, maior será a superfície disponível para o ataque enzimático (Kunze, 2004).

O sucesso da brassagem fica comprometido pela eficácia desde processo. A danificação do amido influencia de forma negativa a sua capacidade de gelatinização e de hidrólise, provocando uma diminuição do rendimento assim como a qualidade do produto final (Mousia *et al.*, 2004; Warpala e Pandiella, 2000). Para além das propriedades do amido, é necessário ter especial atenção ao manuseamento e preservação das suas cascas, pois posteriormente na etapa de filtração estas vão atuar como material filtrante (Mousia *et al.*, 2004).

Empastagem

Empastagem é o termo técnico que corresponde à hidratação e aquecimento do malte moído, permite a ativação das enzimas presentes na matéria prima e conduz à conversão da fração amilácea em açúcares fermentescíveis (glucose, maltose e maltotriose) e dextrinas, dando origem ao extrato de malte solúvel – mosto (Palmer, 2006).

Independentemente do estilo de cerveja, este processo recorre a estratégias que relacionam o binómio tempo/temperatura e as condições ótimas de ativação das enzimas descritas na Tabela 2, de modo a produzir um mosto com as características desejadas.

Geralmente, nesta operação unitária recorre-se a quatro patamares de temperatura. O primeiro corresponde a valores entre 45 e 50° C, com o objetivo de aumentar a solubilidade do malte e das proteínas, assim como ativar a enzima β -glucanase, e consequentemente degradar β -glucanos. Com o aumento da temperatura para 62 - 65° C ocorre o aumento da atividade enzimática através da ação das β -amílases, peptidases e enzimas proteolíticas. Este aquecimento tem como principal objetivo a produção de maltose e a degradação de proteínas. Numa terceira fase, a temperatura é aumentada para os 70 e 75° C com vista à promoção da ação da α -amílase. Este patamar permite a formação de glucose, maltotriose e de outros açúcares. A temperatura final do processo corresponde a 78° C e tem como objetivo a estabilização dos açúcares fermentescíveis e das propriedades do mosto (Willaert, 2006).

Tabela 2 - Principais enzimas envolvidas no processo de empastagem. Adaptado de Willaert (2006).

Enzimas	pH ótimo	Gama de temperaturas ótimas (°C)	Temperatura de inativação (°C)	Produtos Finais
β-amílase	5,4 - 5,6	60 – 65	70	Maltose
α-amílase	5,5 - 5,8	70 – 75	80	Dextrinas
Peptidase	5,0 - 5,5	40 – 60	60 - 80	Péptidos de baixo peso molecular, aminoácidos
β-glucanase	4,5 - 5,0	40 - 45	50 - 55	Glucose Gluco-oligossacaridos

Filtração do mosto (*Sparging*)

Concluída a fase de empastagem, o mosto obtido é sujeito a uma filtração e separação dos grãos de malte demolhados (*dreche*). De modo a garantir a extração eficaz de todos os açúcares residuais ainda presentes nos grãos, procede-se ao *sparging*, ou lavagem do grão, que consiste na lavagem do malte com água à temperatura de 78° C, correspondendo à temperatura final da fase de empastagem (Willaert, 2006).

A temperatura pode limitar a eficiência deste processo, isto porque, apesar de poder atingir valores até 80° C, altas temperaturas provocam a formação de aromas e aparecimento de substâncias indesejáveis, tal como amido não degradado e hemicelulose. À semelhança da temperatura, a duração do processo e o valor de pH também influenciam a etapa de *Sparging*. O aumento do pH contribui para o aparecimento de *off-flavours* e para o aumento da adstringência na cerveja, assim como, a diminuição da velocidade pode levar à extração de substâncias indesejáveis e consequentemente a alterações na qualidade do mosto (Briggs et al., 2004; Palmer, 2006). Depois do escorrimento completo da água do *sparging* o mosto segue para a fase seguinte, ou seja, etapa de ebulição.

Ebulição do mosto

Nesta fase do processo o mosto é aquecido até uma temperatura de 100° C, permanecendo num estado de ebulição durante 60 a 90 minutos. Durante esta etapa o mosto deve estar sob agitação evitando a deposição dos sedimentos que restaram da etapa anterior (*trub* – proteína coagulada que é separada do mosto depois da empastagem), sendo que uma agitação insuficiente ou excessiva irá aumentar o tempo de clarificação do mosto (Hughes e Baxter, 2001; Briggs et al., 2004).

É na etapa de ebulição que se procede à adição do lúpulo, cujas influências se irão refletir nas características da cerveja final. Normalmente podem ser adicionados dois tipos de lúpulos, os de amargor, mais solúveis e responsáveis pelo carácter amargo da cerveja, são adicionados numa fase precoce da ebulição. Por sua vez, os lúpulos de aroma/*flavour*, mais ricos em óleos essenciais e cujos compostos são altamente voláteis, são adicionados numa fase mais tardia, (De Keukeleirc, 2000).

Ao longo desta operação unitária ocorre a inativação das enzimas, a esterilização do mosto, a precipitação das proteínas, a evaporação da água e dos compostos voláteis indesejáveis (por exemplo Dimetilsulfureto), a isomerização dos compostos derivados do lúpulo de amargor e ainda a formação de compostos de *flavour* por reações de *Maillard* (Willaert, 2012).

A etapa de ebulição é ainda responsável pela diminuição do pH do mosto e pela formação de compostos redutores que lhe conferem potencial redox, funcionando como proteção contra as oxidações às quais o mosto é submetido nos processos posteriores (Kunze, 2004; Briggs *et al.*, 2004).

Clarificação e arrefecimento do mosto (Whirlpool)

Terminada a etapa de ebulição procede-se à preparação do mosto para a inoculação das leveduras, através de três processos: clarificação, arrefecimento e arejamento.

O processo de clarificação (*Whirlpool*) do mosto, corresponde à separação dos sedimentos (*trub*) e dos fragmentos de lúpulos, evitando a sedimentação das leveduras durante a fermentação e consequente diminuição do grau de fermentação. Esta remoção garante que o *flavour* e a estabilidade coloidal da cerveja não são comprometidos (Lewis e Young, 2002).

De modo a garantir um arrefecimento rápido do mosto, é comum utilizar um permutador de placas para proteção de eventuais contaminações por bactérias do ar (Bamforth, 2003).

Por último promove-se a oxigenação do mosto através do seu arejamento, critério importante para o desenvolvimento inicial da levedura (Boulton e Quain, 2001).

1.2.3. Fermentação

O processo de fermentação é iniciado pela inoculação do mosto (*pitching*), com leveduras selecionadas de acordo com o produto final que se deseja obter. A concentração típica de inóculo varia entre $1,5 \times 10^6$ e 1×10^7 células de levedura por milímetro de mosto (Lewis e Young, 2002; Willaert, 2012).

De forma a assegurar a eficácia do processo fermentativo, isto é, na conversão do mosto em cerveja devem ser garantidas as condições necessárias à ação das leveduras em especial no que se refere à temperatura.

Os nutrientes do mosto funcionam como substrato para o crescimento das leveduras, resultando na formação dos produtos metabólicos de interesse na quantidade desejada (Boulton e Quain, 2001). A composição do mosto, formado por aproximadamente 80% de compostos fermentescíveis, torna-se um fator limitante da ação fermentativa, influenciando o resultado final do processo (Willaert, 2012).

1.2.3.1. Fermentação alcoólica

Uma das principais características de *Saccharomyces cerevisiae* é a sua capacidade de converter os açúcares em etanol e dióxido de carbono, sob condições aeróbias (respiração) e anaeróbias (fermentação alcoólica).

Na presença de elevadas concentrações de açúcares fermentescíveis, nomeadamente glucose, ou na ausência de oxigénio molecular, ocorre uma inibição do metabolismo respiratório e as leveduras cervejeiras seguem a via fermentativa, designando-se por efeito de *Crabtree*. Este efeito garante assim, que a via fermentativa se encontra ativa durante todo o processo, mesmo na presença de oxigénio.

A fermentação alcoólica (representada na Figura 2) inicia-se com a oxidação de uma molécula de glucose em duas de ácido pirúvico e formação de duas moléculas de ATP (etapa correspondente à glicólise), seguindo-se a conversão do piruvato em duas moléculas de acetaldeído, nesta última reação dá-se a libertação de duas moléculas de dióxido de carbono. Por último, as moléculas de acetaldeído são reduzidas por duas moléculas de NADH originando as duas moléculas de etanol (Tortora *et al.*, 2005).

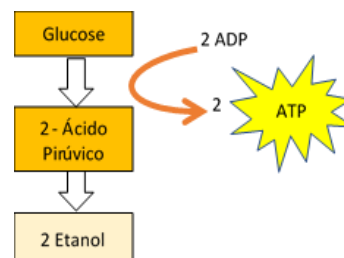


Figura 2 - Esquema representativo da fermentação alcoólica. Adaptado de Tortora *et al.* (2005).

A produção de etanol tem como principal propósito a regeneração do potencial redutor NAD⁺, de modo a manter o equilíbrio redox, evitando a acumulação de NADH e a inevitável interrupção da glicólise (Briggs *et al.*, 2004).

Este é um processo de baixo rendimento energético, dado que a maioria da energia contida na molécula de glucose original permanece no etanol, o principal produto final.

A ação fermentativa de *Saccharomyces cerevisiae* origina ainda, apesar de em menor quantidade, outros metabolitos nomeadamente ácidos orgânicos, compostos carbonilados, compostos fenólicos, polióis, ésteres, álcoois superiores (Briggs *et al.*, 2004).

1.2.3.2. Processos secundários

O metabolismo secundário é constituído por um grupo de processos biológicos dispensáveis ao crescimento celular (Boulton e Quain, 2001), no entanto, os metabolitos secundários que se desenvolvem durante o processo fermentativo possuem uma grande importância sensorial e funcional.

Os metabolitos secundários estão interligados entre si, como demonstra a Figura 3, variando quantitativamente e qualitativamente dependendo da estirpe selecionada e das condições do mosto. Fatores como a composição, a disponibilidade de oxigénio molecular, a temperatura de fermentação, a existência ou não de agitação durante o processo, assim como a velocidade de separação da levedura são fatores que afetam o desenvolvimento dos metabolitos (Lewis e Young, 2002).

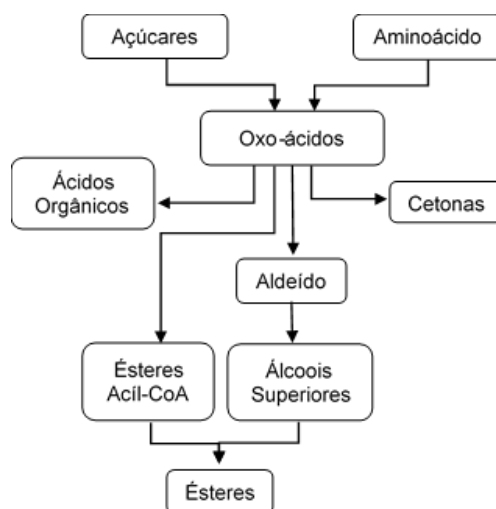


Figura 3 - Interligação entre as diferentes vias metabólicas. Adaptado de Okafor (2009).

Ácidos Orgânicos

Existem vários estudos que indicam que existem cerca de uma centena de ácidos orgânicos ou ácidos gordos de cadeia curta na cerveja (Boulton e Quain, 2001). Estes subprodutos são libertados durante o metabolismo das leveduras, dependendo da estirpe inoculada e do vigor da fermentação. Os ácidos orgânicos podem surgir da biossíntese dos aminoácidos ou através de um ciclo de *Krebs* incompleto, característico da repressão da respiração nas leveduras *Crabtree* positivas, durante o metabolismo dos hidratos de carbono (Briggs *et al.*, 2004; Willaert, 2006).

Estes ácidos podem ser divididos em dois grandes grupos, os voláteis e os não-voláteis. Enquanto os ácidos voláteis (ácido acético, propiónico e isobutírico) presentes em concentrações altas na cerveja provocam odores de ranço, gordura e queijo, os ácidos orgânicos não voláteis (ácido oxálico, cítrico, málico, láctico, succínico, pirúvico e fumárico) contribuem para a diminuição do pH durante a fermentação (Lodolo *et al.*, 2008).

Álcoois Superiores

Os álcoois superiores sintetizados pelas leveduras durante a fermentação representam o maior constituinte dos compostos voláteis. A sua síntese pode ocorrer de duas formas, dependendo da disponibilidade de aminoácidos no mosto, através via anabólica, associada ao metabolismo dos aminoácidos, ou através da via catabólica onde os aminoácidos são sujeitos a um processo de transaminação produzindo o ceto-ácido correspondente. O excesso de ceto-ácidos é descarboxilado em aldeídos e posteriormente reduzido a álcoois superiores (Willaert, 2006).

Na cerveja, a concentração típica de álcoois superiores varia entre 100 e 200 mg/L e podem dividir-se em alifáticos (n-propanol, iso-butanol, 2-metilbutanol e 3-metilbutanol) e em aromáticos, (2-feniletanol, tirosol e triptofol) (Boulton e Quain, 2001).

Os álcoois alifáticos são responsáveis pela intensificação do sabor e aroma alcoólico na cerveja, promovendo uma sensação de quente na boca. A influência dos álcoois aromáticos na cerveja está diretamente dependente do tipo de álcool, como se observa, no caso do álcool aromático 2-

feniletanol que contribui de forma positiva para um aroma doce, por oposição aos aromas indesejáveis associados à presença de tirosol e triptofol que contribuem de forma negativa (Boulton e Quain, 2001). Para além do seu contributo a nível de *flavour* e aroma, estes compostos desempenham um papel secundário importante como precursores da síntese de ésteres.

Ésteres

Os ésteres representam o grupo de compostos produzidos pelas leveduras com maior relevância na composição aromática da cerveja. Apesar da sua concentração residual, pequenas alterações quantitativas têm impacto no *flavour* devido à sua proximidade dos limiares de detenção.

A formação dos ésteres é consequência da modificação dos álcoois superiores que ocorre durante metabolismo das leveduras sob influência da estirpe e da eficiência da atividade enzimática.

Para que ocorra a transformação, o álcool superior une-se a uma molécula de co-enzima A, formando uma molécula de acil-CoA por ação da enzima álcool-aciltransferase (Lewis e Bamforth, 2006).

O processo de formação pode ocorrer pela via aeróbia ou anaeróbia. Quando a reação ocorre em meio oxigenado, a molécula de acil-CoA entra no Ciclo de *Krebs* para formar ATP (respiração). Na ausência de oxigénio a molécula é enzimaticamente esterificada com o álcool, originando o acetato de etilo como produto final (Pires *et al.*, 2014).

Os ésteres, ácidos gordos de cadeia média, podem ser divididos em dois grupos: os ésteres de acetatos e os ésteres de etilo. A sua presença na cerveja pode contribuir de forma positiva ou negativa consoante o tipo de éster formado. Dado que o etanol é o principal álcool produzido pela levedura, o éster mais comum na cerveja corresponde ao acetato de etilo. Na Tabela 3 são apresentados alguns exemplos de ésteres e a sua contribuição para o aroma da cerveja (Lewis e Young, 2002).

Tabela 3 – Ésteres da cerveja, e respetivos descritores (Bamforth, 2004)

Ester	Descritor de <i>Flavour</i>
Acetato de etilo	Solvente, fruta
Acetato de butilo	Banana, doce
Acetato de isoamilo	Banana, maçã
Propionato de isoamilo	Ananas, anis
Acetato de feniletilo	Rosas, mel

Compostos Carbonilados

Os compostos carbonilados formam-se durante a produção do mosto e durante a fermentação. Por consequência, a eficiência do metabolismo das leveduras constitui um condicionante da concentração final de aldeídos, que resultam da descarboxilação dos ceto-ácidos associada à formação dos álcoois superiores (Willaert, 2006), e da concentração final das cetonas,

subprodutos da via anabólica dos aminoácidos, que se encontram associadas à síntese de valina e isoleucina.

O aparecimento de aldeídos, como etanal, e de cetonas, como diacetilo, na cerveja é indesejável, uma vez que, os aldeídos introduzem um aroma a maçã verde, muito comum na cerveja antes da maturação, e as cetonas estão associada a notas amanteigadas (Willaert, 2006).

A presença destes compostos pode estar associada a contaminações microbiológicas, que conferem extrema importância ao controlo da fermentação sendo necessário assegurar que estes compostos se encontram em concentrações aceitáveis.

Compostos Fenólicos

O mosto constitui a principal fonte de compostos fenólicos, no entanto, a microbiota presente e o seu metabolismo também interferem na sua formação.

Durante a fervura ou sob influência de algumas bactérias e leveduras selvagens ocorre a descarboxilação dos ácidos fenólicos em compostos fenólicos (Briggs *et al.*, 2004), por exemplo por conversão do ácido *p*-cumárico em 4-Etilfenol.

Estes compostos podem também ser produzidos pela estirpe de *S. cerevisiae* e conferem à cerveja um *flavour* indesejável na maioria dos tipos de cerveja, embora em certos estilos específicos como *Weissbier* possa ser desejável (Walker e Stewart, 2016).

Polióis - Glicerol

No processo produtivo da cerveja, o envolvimento deste grupo de compostos está única e exclusivamente relacionado com a formação de glicerol. Este, considerado um dos principais metabolitos secundários em conjunto com o ácido succínico, pode ser encontrado na cerveja em concentrações de 1 a 3 g/L sendo também o composto que se encontra em maior concentração na cerveja, depois do etanol e do dióxido de carbono (Scanes *et al.*, 1998; Walker e Stewart, 2016).

O glicerol pode ser produzido durante o metabolismo da levedura ou como resposta desta a uma circunstância de stress osmótico, desempenhando um papel de controlo do potencial redox, através da reoxidação de NADH, e de osmoprotetor (Scanes *et al.*, 1998). Este composto é essencial para o "corpo" da cerveja, mas está também associado a uma sensação viscosa e desagradável na boca (Boulton e Quain, 2001).

1.2.4. Maturação

A maturação engloba todas as alterações que ocorrem durante a transformação da cerveja verde em cerveja maturada (Briggs *et al.*, 2004).

Após a fermentação, a cerveja fica em repouso durante um determinado período, tendo como finalidade a obtenção de um produto final estável, do ponto de vista microbiológico, físico e sensorial. Durante este período ocorre um ajustamento na concentração dos compostos indesejáveis, nomeadamente cetonas, acetaldeído e sulfureto de hidrogénio, melhorando o *flavour* e o aroma da cerveja (Eaton, 2006).

O processo de maturação envolve, geralmente, uma diminuição da temperatura, promovendo a clarificação da cerveja por precipitação da levedura floculada e outros sedimentos, nomeadamente proteínas e complexos polifenólicos (Stewart, 2006). A cerveja é posteriormente submetida a um processo de filtração para remover a levedura residual e as restantes partículas em suspensão.

A cerveja maturada e devidamente filtrada deve ainda ser sujeita a um ajustamento do nível de carbonatação antes do seu consumo, de forma a compensar a quantidade de dióxido de carbono (CO₂) libertada ao longo dos processos. Numa perspetiva industrial esse rearranjo é realizado por injeção de CO₂ diretamente na embalagem final (Stewart, 2006). No caso do fabrico artesanal este processo ocorre por adição de açúcar numa concentração específica durante o próprio processo de maturação, permitindo a reativação do metabolismo primário da levedura, conduzindo à produção de CO₂ na quantidade desejada, não existindo processo de filtração, o que conduz frequentemente a que as cervejas artesanais tenham algum depósito na garrafa.

1.3. Caracterização das leveduras intervenientes na produção de cerveja

A levedura pode ser definida como um microrganismo unicelular e eucariota, inserido no reino *Fungi*. As leveduras reproduzem-se assexuadamente por processos de gemulação ou fissão, que possibilitam a duplicação do material genético no núcleo da célula, assegurando desta forma, que as células-filhas herdem exatamente as mesmas potencialidades da célula que lhes deu origem, também denominada de célula-mãe (Kurtzman, 2011a). Este tipo de reprodução ocorre numa cuba de fermentação, tornando desta forma possível recolher e utilizar novamente a levedura em fermentações posteriores, apesar de apresentarem um tempo de vida útil limitado (White e Zainasheff, 2010).

As leveduras utilizadas no processo cervejeiro pertencem ao género *Saccharomyces*. *Saccharomyces sensu stricto* é um complexo de espécies que inclui a maior parte das estirpes de leveduras relevantes nas fermentações industriais, como *Saccharomyces bayanus*, *S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, e *S. pastorianus* (Stewart, 2006).

Ao nível da indústria cervejeira, as leveduras são classificadas com base no seu comportamento de floculação, podendo então ser denominadas por leveduras do tipo *a/e*, que apresentam alta fermentação (*S. cerevisiae*), e do tipo *lager* de baixa fermentação (*S. pastorianus*) (Tabela 4) (Lodolo *et al.*, 2008).

A importância destes microrganismos advém de vários fatores, nomeadamente da sua capacidade de se multiplicarem rapidamente sob condições aeróbias e anaeróbias, associada à aptidão para converter diferentes açúcares simples em álcool e dióxido de carbono (Flagfeldt *et al.*, 2009).

A maioria das leveduras identificadas são anaeróbias facultativas, e dependendo das condições de crescimento, do tipo e concentração de açúcar e/ou oxigénio disponível, o metabolismo pode realizar processos de respiração, de fermentação ou mesmo até os dois, num processo conjunto denominado como metabolismo fermento-respiratória.

Tabela 4 - Características que distinguem os diferentes tipos de leveduras empregues no processo cervejeiro. Adaptado de (Dietvorst *et al.*, 2005).

TIPO DE LEVEDURA	CARACTERÍSTICAS
Levedura do tipo “ale” “alta fermentação” <i>Saccharomyces</i> - <i>cerevisiae</i>	<ul style="list-style-type: none"> • No final da fermentação as leveduras ascendem ao topo das cubas de fermentação, devido às características hidrofóbicas da sua membrana celular; • Fermentação a temperaturas mais elevadas (18-24° C); • Não utiliza o dissacarídeo melibiose; Não consome totalmente a maltotriose disponível; • Podem crescer a 37° C; • Processo de fermentação mais rápido.
Levedura do tipo “lager” “baixa fermentação”; <i>Saccharomyces</i> : - <i>pastorianus</i> ; - <i>uvarum</i> ; - <i>carlsbergensis</i> .	<ul style="list-style-type: none"> • No final da fermentação as leveduras sedimentam no fundo das cubas de fermentação, devido às características hidrofílicas da sua membrana celular; • Fermentação a temperaturas mais baixas (8-14° C); • Processo de fermentação mais lento; • Utiliza o dissacarídeo melibiose, uma vez que possui o gene que produz a enzima extracelular α-galactosidase; • Maior facilidade em realizar uma fermentação completa; • Não apresenta crescimento a temperaturas superiores a 34° C.

As leveduras da espécie *S. cerevisiae*, entre outras espécies, têm capacidade de realizar o processo que conjuga fermentação e respiração. No entanto, durante o metabolismo celular sob condições aeróbias, recorrem frequentemente à fermentação, em detrimento do processo respiratório, como resultado de repressão pelo açúcar disponível (efeito de *Crabtree* positivo) (Bolotin-Fukuhara, 2006). Existem no entanto outras leveduras como *P. kluyveri* e *M. pulcherrima* (não-*Saccharomyces*) que utilizam exclusivamente a respiração, denominando-se então por leveduras não-fermentativas (Moller *et al.*, 2002; Pfeiffer e Morley, 2014; Quirós *et al.*, 2014).

1.3.1. Género *Saccharomyces*

As leveduras do género *Saccharomyces* assumem uma posição dominante como culturas de arranque (*starters*) das fermentações industriais. As suas características fenotípicas, tais como, a capacidade de produção eficiente de elevadas quantidades de etanol, a utilização da fermentação como via metabólica preferencial combinada com efeito *crabtree* positivo (respiração por glucose é inibida e produção de etanol aumenta em presença de elevadas concentrações de açúcar), e ainda, a sua elevada tolerância a etanol e/ou stresses abióticos, conduzem a que estas sejam selecionadas para conduzir a maioria dos processos fermentativos controlados (Basso *et al.*, 2016).

1.3.1.1. *Saccharomyces cerevisiae*

A diversidade genética e fenotípica deste tipo de leveduras possibilita a sua entrada em diferentes produtos, como cerveja, pão, vinho, cidra e queijos. A sua capacidade de crescer rapidamente em condições anaeróbias, faz com que esta espécie seja uma das mais utilizadas na indústria, permitindo contornar os baixos níveis de oxigénio que surgem durante as fermentações de larga-escala (Flagfeldt *et al.*, 2009).

Morfológicamente esta estirpe apresenta um formato oval, elipsoidal ou cilíndrico, ocasionalmente em pequenas cadeias ou aglomerados, com dimensões médias de: 2.5-4.5 x 10.5-20 µm (Kurtzman, 2011a).

Apesar do seu papel fundamental nas fermentações alcoólicas *S. cerevisiae* (Figura 4) é facilmente refermentada depois do produto final já estar engarrafado, conduzindo ao aumento de turvação e de gás, o que pode nem sempre ser considerado um aspeto positivo no produto final.

Na produção de cerveja, a sua valorização está também diretamente relacionada com a capacidade de realizar a fermentação completa dos açúcares e a utilização de mono-, di- e trisacáridos, e ainda a capacidade de desenvolver um *flavour* e um perfil aromático desejável no produto final caracterizado por notas frutadas (Lodolo *et al.*, 2008; Polaina, 2002).

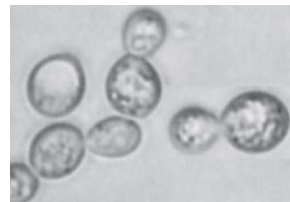


Figura 4 - *S. cerevisiae* (Kurtzman, 2011a)

1.3.1.2. *Saccharomyces pastorianus*

Esta espécie, também conhecida por *Saccharomyces uvarum* ou *Saccharomyces carlsbergensis* (Figura 5), é responsável por fermentações tipo *lager*. Esta espécie híbrida tem origem na combinação dos genomas de *S. eubayanus* (estirpe não convencional) e de *S. cerevisiae* (De León-Medina *et al.*, 2016). As leveduras *lager* fermentam a uma temperatura baixa e têm capacidade de assimilar a melibiose, razão pela qual as cervejas obtidas pela ação desta estirpe apresentam menor concentração de açúcares residuais, como resultado da utilização mais eficiente de maltotriose (Dietvorst *et al.*, 2005; Vidgren, 2010).

A sua ação fermentativa permite a conversão dos açúcares em álcoois superiores e ésteres (ex. diacetil, dimetil sulfeto e sulfureto de hidrogénio), que conduzem a *off-flavours* inconvenientes nas cervejas *lager* (Kobayashi *et al.*, 2008).

De modo a permitir a conversão completa destes compostos é importante garantir uma etapa de maturação prolongada.

Ao nível morfológico esta estirpe assemelha-se a *S. cerevisiae*, apresentando células globosas, elipsoidais ou cilíndricas com dimensões médias entre 2.2-8 x 3.5-13.5 µm (Kurtzman, 2011a).

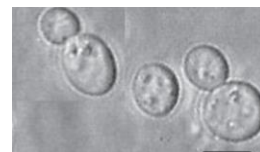


Figura 5 - *S. pastorianus* (Kurtzman, 2011a)

Este tipo de cerveja é caracterizado por um carácter “limpo” e pouco aromático (Krogerus *et al.*, 2015). A produção de cerveja *lager* representa 90% da produção mundial (Petruzzi *et al.*, 2016). São exemplos deste tipo de cerveja as *Pilsners*, as *Dortmunders*, as *Märzen* e as *Bocks*.

1.3.2. Género Não-*Saccharomyces*

A grande maioria dos processos fermentativos para produção de cerveja ocorre exclusivamente na presença de leveduras do género *Saccharomyces*, sendo a presença de qualquer outra

levedura considerada um defeito. No entanto, o mercado cervejeiro tem sofrido inovações, como consequência do aumento do interesse global em cerveja artesanal e da necessidade de diferenciação dos seus produtores.

A incorporação de espécies não-*Saccharomyces* no processo produtivo de cerveja possibilita um leque de novas perspectivas quer a nível das técnicas, quer a nível do produto final. Estas espécies conferem ao produto final características sensoriais complexas e estão frequentemente associadas à produção de cervejas com baixo teor de álcool, como resultado total ou parcial inaptidão destas espécies fermentarem a maltose disponível (Basso *et al.*, 2016; Brányik *et al.*, 2015).

1.3.2.1. *Pichia kluyveri*

A espécie *Pichia kluyveri*, é uma espécie de levedura que se distingue pelo seu formato ovoide e está presente em fermentações naturais dos produtos agrícolas, isolada a partir de diferentes fermentações vinárias (Figura 6). Apresenta capacidade multiplicativa e fermentativa quando cultivada em meio de glucose, não se verificando crescimento em meios de maltose e de ciclohexamida (Kurtzman, 2011b; Morneau *et al.*, 2011).

Na produção de cerveja, a utilização de *P. kluyveri* resulta em inovações no mercado, permitindo obter uma cerveja com um teor alcoólico baixo, apresentando no final da fermentação do mosto aproximadamente 4% (v/v etanol), apesar deste valor depender da quantidade de glucose presente no mesmo (Michel *et al.*, 2016).

A sua capacidade de converter a glucose do mosto, conduz ao aumento da concentração de acetato de isoamilo, éster composto pelo ácido acético e pelo álcool isoamílico, associado ao odor de banana e de pera, assim como ao aparecimento de butirato de etilo e hexanoato de etilo (aroma a solvente maçã verde, respetivamente) (Steensels e Verstrepen, 2014; Kurtzman, 2011b).

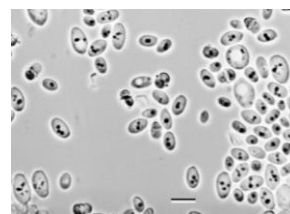


Figura 6 - *P. kluyveri*
(Kurtzman, 2011b)

1.3.2.2. *Metschnikowia pulcherrima*

As levedura da família *Metschnikowiaceae*, do género *Metschnikowia* e da espécie *Metschnikowia pulcherrima*, têm como habitat natural flores, plantas e frutos maduros, nomeadamente nas uvas, onde, normalmente, intervêm numa primeira fase da sua fermentação (Kántor *et al.*, 2015).

Esta espécie é caracterizada por um formato que pode variar entre oval a redondo (Figura 7), crescendo por gemulação multilateral na presença de glucose e maltose. *Metschnikowia pulcherrima* é designada por estirpe não-fermentativa, utilizando exclusivamente a respiração no seu metabolismo celular (Pfeiffer e Morley, 2014; Quirós *et al.*, 2014), sendo caracterizada durante este processo pela produção de enzimas extracelulares (Maicas e Mateo, 2015).



Figura 7 – *M. pulcherrima*
(Viticulture & Enology, 2017)

Esta levedura é mais recorrente na produção de vinho e a sua ação fermentativa é mais rápida em comparação com *Saccharomyces*. No entanto, estas duas espécies devem ser utilizadas em paralelo, dado que a capacidade fermentativa da *M. pulcherrima* termina quando o teor alcoólico do mosto atinge os 5%, isto é, quando a sua sensibilidade ao etanol impede a continuação do metabolismo, a viabilidade da fermentação é depois assegurada pela *Saccharomyces*.

A ação da *M. pulcherrima* conduz à libertação de compostos aromáticos voláteis, proporcionando aromas varietais (tióis voláteis) ricos e complexos, tal como uma larga escala de álcoois e esteres (Chantasuban, 2016; Oro *et al.*, 2014).

1.3.2.3. *Saccharomyces ludwigii*

Saccharomyces ludwigii é uma levedura tradicionalmente isolada no vinho, caracterizada por uma alta tolerância à presença de etanol e dióxido de enxofre, que permite a sua sobrevivência na maioria dos vinhos, e uma boa resistência ao ácido acético. Esta espécie distingue-se microscopicamente pelas suas células isoladas, ovaladas e com formato de solas de sapato (Figura 8).

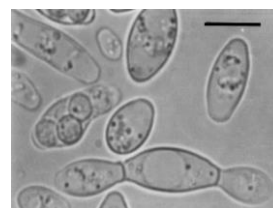


Figura 8 – *S. ludwigii*
(Boundy-Mills *et al.*, 2011)

Esta espécie para além de apresentar capacidade fermentativa na presença de glucose, frutose e sacarose, apresenta ainda total ou parcial inaptidão de fermentar a maltose, o principal açúcar fermentável presente no mosto, diferenciando-se assim do comportamento metabólico de *S. cerevisiae* (Brányik *et al.*, 2015).

Segundo Francesco e colaboradores (2015), a fermentação ocorre de forma mais rápida nos primeiros três dias, diminuindo velocidade até ao sétimo, e último dia de fermentação, sendo que o produto final pode apresentar um teor alcoólico inferior a 1% (v/v) de etanol. Estudos anteriormente desenvolvidos indicam que pode existir consumo de maltose durante o processo metabólico, dependendo da concentração de açúcares disponíveis e dos valores de pH do mosto (Michel *et al.*, 2016). A presença desta estirpe conduz à produção de altos níveis de acetato de etilo e de diacetil, que induzem um *flavour* desagradável na cerveja, associado a baixos teores alcoólicos (Francesco *et al.*, 2015).

1.3.3. Outras leveduras não convencionais

Apesar do consumo de cerveja estar cada vez mais presente na cultura mundial e dos avanços tecnológicos serem notórios desde a sua descoberta, ainda são poucos os estudos desenvolvidos relativamente à introdução de leveduras não-convencionais na sua produção.

A introdução de novas espécies e estirpes de leveduras, como as dos géneros *Hanseniaspora*, *Torulaspora* e *Wickerhamomyces*, permite uma diversificação enzimática e uma bioconversão que enriquece o *flavour* da cerveja, reduzindo as calorias e o conteúdo alcoólico. São apontadas também como exemplos de leveduras com grande potencial de co-inoculação ou fermentações sequenciais *Wickerhamomyces anomalus*, *Lachancea thermotolerans* e *Cyberlindnera saturnus*.

Por exemplo, *Wickerhamomyces anomalus* possui mecanismos eficientes de adaptação a fatores de stress, apesar da sua sensibilidade ao etanol e acetato, apresentando grande tolerância a altas pressões osmóticas (Belitz *et al.*, 2009).

Já no caso da introdução de *L. thermotolerans* no processo fermentativo, é bastante benéfica dado que apresenta tolerância ao lúpulo, forma uma espuma estável e sensorialmente desenvolve na cerveja notas ácidas, sem ser necessário recorrer a bactérias lácticas durante a fermentação (Callejo *et al.*, 2017).

Para além destas espécies, neste âmbito da produção de cervejas sem álcool, foram desenvolvidos outros estudos que revelaram resultados interessantes, nomeadamente com a introdução das estirpes *Wickerhamomyces subpelliculosus* e *Cyberlindnera saturnus* (Callejo *et al.*, 2017).

1.4. Características sensoriais das cervejas

O perfil sensorial das cervejas, incluindo os defeitos que possam existir, podem ser descritos por uma grande variedade de termos. Associados ao sabor é muito comum encontrar os termos amargo, salgado, metálico e alcalino, existindo ainda termos que podem definir características aromáticas e de sabor como azedo, doce e corpo (Belitz *et al.*, 2009).

Um dos principais critérios associados ao sabor da cerveja é a espuma, que varia dependendo do estilo de cerveja. Esta pode ser distinguida pelo volume, produzido pelo conteúdo em dióxido de carbono, a densidade e estabilidade, causada principalmente pela degradação de proteínas e compostos de lúpulo.

O *flavour* ou aromas ativos da cerveja estão diretamente ligados ao tipo de compostos que nela se desenvolvem por extração ou síntese ao longo do processo. A grande maioria dos compostos são produzidos durante a fase fermentativa, como produtos intermediários do metabolismo da levedura ou sub produtos (Pires *et al.*, 2014).

São exemplo disso os ésteres (frutados, bananas, mel, rosas), os álcoois, (*flavour* alcoólico e viscoso), os ácidos (vinagre e amanteigado), e ainda os aldeídos (*flavour* a maçãs verdes, melão e bananas verdes) (Bamforth, 2004). Os defeitos da cerveja são resultados de uma produção e armazenamento inadequados, prejudicando o aroma e sabor do produto final e estão associados a descritores como áspero, duro e amargo.

Durante a etapa de maturação das cervejas também ocorrem mudanças importantes no sabor, permitindo desenvolver a identidade e individualidade de cada produto/marca (Briggs *et al.*, 2004). Estas alterações são difíceis de caracterizar e otimizar, e nem sempre são fáceis de controlar face ao efeito adverso das reações de oxidação que ocorrem em consequência da presença de oxigénio.

2. Materiais e Métodos

2.1. Estirpes de leveduras, condições de crescimento e manutenção das culturas

A realização deste estudo foram selecionadas diferentes estirpes de leveduras indicadas na Tabela 5, estão também apresentados os substratos de isolamento, os códigos de identificação e as temperaturas ideais de fermentação.

Tabela 5– Estirpes de leveduras utilizadas.

Estirpe	Código ISA	Código	Substrato de isolamento/empresa de fabrico	Tº C fermentação
<i>Pichia kluyveri</i>	1441	PYCC 4377	Água	25-35
<i>Saccharomyces ludwigii</i>	1886	CECT 10450	Mosto de Uva	26
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	1808	PYCC 4830	Uvas da casta Lambrusca	25-39
<i>S.cerevisiae</i> Safale S-04	-	-	Fermentis	18-24
<i>S.cerevisiae</i> Saflager S-23	-	-	Brewferm	10-15
<i>S.cerevisiae</i> Blanche	-	-	Brewferm	18-24

As estirpes não-*Saccharomyces* selecionadas foram obtidas diretamente da biblioteca de leveduras do ISA. Estas foram cultivadas em meio sólido (extrato de levedura 0,5% (m/v); peptona 1% (m/v); glucose 2% (m/v); agar 2% (m/v)) e incubadas a 28º C até crescimento visível das colónias. Posteriormente as placas foram mantidas a 4º C.

As estirpes comerciais desidratadas *S.cerevisiae* Safale foram adquiridas na empresa LX Brewery, e *S. pastorianus* Lager e *S. cerevisiae* Blanche na Oficina da Cerveja. À semelhança das restantes estirpes estas foram plaqueadas em meio YPD sólido (extrato de levedura 0,5% (m/v); peptona 1% (m/v); glucose 2% (m/v); agar 1% (m/v)) e refrigeradas a 4º C.

Antes da utilização das estirpes foi preparada uma cultura em meio YPD líquido (extrato de levedura 0,5% (m/v); peptona 1% (m/v); glucose 2% (m/v)). Para tal preparou-se como suspensão de células com meio YPD líquido a partir das culturas em placa. A biomassa de cada cultura foi retirada das placas correspondentes e depois inoculada por ansa. As suspensões foram incubadas a 28º C com agitação orbital de 170 rpm, durante 24-48h até DO 640nm de quatro.

2.2. Ensaios fermentativos

2.2.1. Matérias-primas utilizadas

As receitas utilizadas para os três estilos de cerveja e programas de brassagem correspondentes, encontram-se detalhados no Anexo I.

Malte

Para a preparação do mosto de *Stout* e *Dunkel* os maltes foram obtidos na empresa LX Brewery, Lda oriundos do fornecedor Castle Malting (Bélgica). A moagem da mistura de maltes foi realizada com auxílio do Piccolo 15 S 400V (Sommer, Alemanha) (Garcia, 2017). Por sua vez, o malte utilizado no mosto de *Weissbier* foi obtido na loja Oficina da Cerveja.

Lúpulo

Os lúpulos utilizados no mosto de *Stout* e *Dunkel* foram obtidos na empresa LX Brewery, Lda, do mesmo fornecedor do malte, e armazenados a vácuo e a -18°C de modo a minimizar a volatilização de aromas, antecedendo a sua utilização na brassagem. À semelhança do malte, o lúpulo utilizado na preparação do mosto de *Weissbier* foi obtido na loja Oficina da Cerveja, tendo sido utilizado os lúpulos do tipo *Northern Brewer*, *Hallertauer Hersbrucker*, *Hallertauer Perle*.

2.2.2. Processo produtivo

Os mostos utilizados na produção de cerveja estilo *Stout*, *Dunkel* e *Weissbier* foram previamente preparados num trabalho anterior, tendo sido congelados e mantidos congelados, até utilização a -80°C (Garcia, 2017). Foram produzidos cerca de 20L de mosto de estilo *Stout*, *Weissbier* e *Dunkel*, recorrendo ao equipamento *Braumeister* 20L (Speidel, Alemanha).

O processo produtivo é comum aos diferentes estilos de cerveja. Numa fase inicial foram utilizados aproximadamente 18L de água do Luso, sendo que 7L correspondem à água de *sparging* (70°C).

Posteriormente, com o auxílio de uma pá desinfetada, promoveu-se a centrifugação do mosto, conduzindo à concentração do sedimento formado durante a ebulição no centro do equipamento.

Terminada a fase de ebulição, procedeu-se ao arrefecimento do mosto com recurso a um arrefecedor em serpentina de aço inoxidável oco. Assim que a temperatura atingiu os 25°C (temperatura que possibilita a inoculação das leveduras) o mosto foi vertido para um balde fermentador a uma distância suficiente de modo a promover a sua oxigenação.

2.2.3. Fermentação do mosto

Os ensaios fermentativos foram realizados, em duplicado, de acordo com o estabelecido em Garcia (2017).

As fermentações foram conduzidas em frascos *Schott* de um litro, previamente esterilizados, e adaptados com um borbulhador com álcool. Cada um dos frascos foi inoculado com uma das espécies de leveduras não-*Saccharomyces* em estudo. Paralelamente, como controlo, foi inoculado um ensaio com a levedura comercial correspondente ao estilo de cerveja pretendido (Figura 9).

De modo a garantir a fermentação completa dos açúcares procedeu-se, após um período de tempo determinado, à inoculação com a estirpe comercial. No caso dos mostos *Stout* e *Weissbier* a inoculação realizou-se ao fim de 48 horas e no caso do mosto *Dunkel* ao fim de 96 horas.



Figura 9 – Exemplos dos frascos Shott utilizados nos diferentes ensaios em mosto *Stout* (A) e *Dunkel* (B).

Para a quantificação da biomassa dos *starters* procedeu-se à análise espectrofotométrica, com recurso ao espectrofotómetro Ultrospec2100pro (Amersham Biosciences, Reino Unido), com a leitura das absorvâncias sendo realizada a 640 nm, tomando por base que valor de absorvância de 1 equivalia a uma concentração aproximada de $3,3 \times 10^7$ cel/mL.

No estilo *Stout* e *Weissbier*, a fermentação ocorreu durante 7 dias, com temperatura constante a 25° C. No caso do ensaio *Dunkel*, a fermentação teve uma duração de 14 dias, permanecendo a temperatura de 15° C durante as primeiras 48h e a 12° C durante o restante tempo.

2.2.4. Engarrafamento e maturação

Finalizado o período de fermentação definido, o mosto fermentado foi distribuído em garrafas com volume de 200 e 250 mL para posterior prova preliminar e análise sensorial.

De modo a proporcionar a carbonatação da cerveja, adicionou-se sacarose (açúcar branco, Continente) em cada garrafa. A concentração e volume adequado a adicionar foi determinada em Garcia, 2017, com o auxílio da ferramenta on-line *Beer Priming Calculator* (Brewer's Friend, 2013).

Desta forma, a concentração ideal de sacarose para a cerveja estilo *Stout* corresponde a um valor de 3,75 g de sacarose/L e de 7,5 g de sacarose/L para os estilos *Weissbier* e *Dunkel*. A cerveja engarrafada foi deixada a maturar durante um mês, inicialmente a 20° C durante 15 dias, no caso dos estilos *Stout* e *Weissbier*, e a 12° C, durante os primeiros 7 dias para o estilo *Dunkel*. Os três ensaios foram mantidos a 5° C durante o restante período de tempo, até à prova sensorial.

Em qualquer das inoculações, o volume de inoculo adicionado corresponde ao necessário para obter 1×10^6 cel/mL de mosto, o mesmo aconteceu na co-inoculação posterior.

2.3. Análises microbiológicas

A análise microbiológica foi realizada durante todo o processo fermentativo, permitindo um acompanhamento do crescimento e evolução das diferentes leveduras nos diferentes mostos.

2.3.1. Determinação do número de células viáveis

A contagem de leveduras foi realizada ao longo do seu crescimento com auxílio de um hemocitómetro, após coloração com azul de metileno.

De acordo com a previsão de células presentes no mosto, amostra não diluída ou diluída numa razão de 1:2 foi incubada com o mesmo volume de azul de metileno durante 15 minutos, após o que foi colocada no hemocítmetro

Este método permite a contagem das leveduras viáveis e não-viáveis visíveis uma vez que as células viáveis contêm enzimas capazes de reduzir o reagente a compostos incolores. Quando imersas no azul de metileno as células mortas não reduzem e que consequentemente são tingidas de azul.

Procedeu-se à contagem dentro da quadrícula central do hemocítmetro, composta por 25 quadrados de tamanho idêntico, que admite um volume de 0,1 mm³.

2.3.2. Determinação do número de células cultiváveis

Tendo em consideração a previsão do número de leveduras presentes no mosto, e de modo garantir que o número de colónias por placa se situasse entre 30-300 UFC, as amostras foram diluídas em água miliQ até um máximo de 10⁸ vezes. O plaqueamento, realizado em duplicado, ocorreu por espalhamento à superfície de 100 µL de suspensão em meio YPD sólido com incubação a temperatura ambiente durante 72h. Terminado este tempo de crescimento procedeu-se à contagem do número de colónias por placa.

2.3.3. Determinação da turvação

A turvação das amostras, previamente agitadas, foi determinada com recurso ao espectrofotómetro Ultrospec2100pro, com leitura da densidade ótica a 640 nm.

2.3.4. Determinação da proteína

A determinação da proteína presente nas amostras realizou-se a partir da leitura em duplicado, da densidade ótica a 595 nm das amostras previamente preparadas. A preparação das amostras consistiu numa centrifugação durante 2 minutos, seguida da sua diluição em água desmineralizada numa razão de 1:10 seguido de uma adição de re-proporção 1:1 com o reagente *Coomassie Plus Protein Assay* (Pierce, USA).

2.4. Análises dos parâmetros físicos e químicos

Com o objetivo de caracterizar o desempenho das leveduras, ao longo da fermentação foram efetuadas análises químicas complementares, em diferentes tempos, e ainda aos produtos finais após o período de maturação.

Ao longo deste período, recolheram-se as amostras, centrifugaram-se e recolheu-se o sobrenadante, que foi utilizado nas determinações a seguir descritas.

2.4.1. Determinação do pH

Os valores de pH foram determinados com recurso a um eletrodo de pH (Broadley James Corporation, Inglaterra) ligado ao potenciómetro pH82 (Merck, EUA). A calibração do eletrodo foi realizada com soluções tampão de pH 7 e 4 (Sigma-Aldrich, EUA).

2.4.2. Determinação da densidade

A densidade das amostras foi realizada com auxílio de uma balança analítica pesando 1000 µL de mosto. Foram realizadas três leituras de cada amostra, sendo que o resultado final apresentado reflete a sua média.

2.4.3. Determinação °Brix

A determinação do °Brix foi realizada com recurso ao refratômetro HI 96801 ATC (Hanna, Inglaterra) com capacidade de medição entre 0-85%. Antes de se proceder à leitura das amostras estas foram previamente agitadas no vortex. A calibração do dispositivo foi realizada sempre que necessária com água desmineralizada.

2.4.4. Determinação dos açúcares redutores (Keto-Diabur-Test 5000)

A realização do Teste Keto-Diabur-Test 5000 (Roche, Alemanha) permite obter uma estimativa da quantidade de glucose presente nas amostras. As diferentes amostras foram colocadas nas tiras do teste e aguardou-se 2 minutos até ser registado o valor final. Este método apresenta uma amplitude de leitura entre os 1000 e os 5000 mg de glucose/dL, sendo o seu limite prático de deteção aproximadamente 50 mg/dL.

2.4.5. Determinação dos açúcares, etanol, glucose e ácidos orgânicos (HPLC)

A recolha das amostras para HPLC ocorreu ao longo de todo o processo, de forma semelhante ao realizado para as restantes análises, tendo sido imediatamente congeladas até tratamento e realização da análise.

O tratamento das amostras consistiu numa fase inicial na sua descongelação, à temperatura ambiente, e posterior centrifugação durante 10 minutos a 12000 g. Depois de recuperado o sobrenadante procedeu-se à adição de ácido perclórico (70% (v/v), Merck) numa concentração de 30 µL/mL de amostra, e a solução foi colocada em gelo durante 30 minutos.

De seguida, as amostras foram novamente centrifugadas a 12000 g num período de 10 minutos. O sobrenadante recuperado foi depois diluído com água miliQ numa razão de 1:10 até às primeiras 48h e de 1:5 nos tempos restantes. A fase final da preparação consistiu na filtração da amostra com filtros Milipore de 0,22 µm de diâmetro de poro (BGB-Analytik, EUA) diretamente para o tubo/vial de amostra do cromatógrafo.

O cromatógrafo de HPLC utilizado inclui: forno com controlador de temperatura (CROCO-CIL, Portugal); sistema de bomba de injeção (515 HPLC Pump, Waters) com módulo de controlo (pump control module I, Waters); coluna de exclusão iónica para análise de açúcares e ácidos orgânicos (SUGAR SH1011, Shodex); injetor automático (Autosampler 717 plus, Waters) e um detector de índice de refração (Refractive Index Detector 2414, Waters) (Garcia, 2017).

As corridas foram realizadas em triplicado e cada injeção teve duração de 45 minutos. O processo foi conduzido com a coluna a 50° C e um fluxo de 0,5 mL/min de ácido sulfúrico 5 mM, sendo que foram introduzidos no sistema 10 µL de amostra por cada injeção.

Para a realização da análise procedeu-se também à preparação do eluente (fase móvel) e da água miliQ. O eluente foi preparado a partir da diluição de uma solução inicial de 25 mM de ácido sulfúrico (BDH, Inglaterra), previamente filtrada (membrana 47 mm de diâmetro, porosidade de 0,2 µm) sob vácuo. A solução preparada sofreu ainda desarejamento, também em sistema de vácuo sob agitação, com recurso de uma placa magnética e um íman. Por sua vez, a água miliQ foi sujeita a filtração e desarejamento num sistema de ultrassons.

A determinação da concentração dos compostos de interesse nas amostras teve por base as curvas de calibração cedidas por Garcia, 2017 (Anexo II).

2.4.6. Análise sensorial

A avaliação sensorial foi realizada com base nas degustações efetuadas de um cervejeiro profissional, cuja ficha de prova utilizada se encontra no Anexo III. A avaliação dos produtos finais obtidos em mosto *Weissbier* e *Stout* foi realizada por comparação com produtos de referência, cerveja *Franziskaner Hefe-Weissbier* e cerveja *Kurofone - The Fisherman*, respetivamente. Enquanto que no caso das cervejas estilo *Dunkel* a avaliação sensorial foi realizada em função do conhecimento prévio das características deste tipo de cerveja.

2.4.7. Análise estatística

Sempre que necessário foi realizada a análise estatística fatorial de variâncias aos diferentes ensaios, com recurso ao programa estatístico *Statistix 9.0* (Analistic Software, 2009). Quando registadas diferenças significativas (para p-values <0,05), efetuou-se a comparação das médias com base no teste Turkey-Kramer HSD.

3. Resultados e Discussão

As leveduras são as principais responsáveis pela fermentação alcoólica, tal como, pela definição das propriedades organoléticas do produto final. Durante a fermentação desenvolvem-se diversos metabolitos secundários, como resultado da atividade metabólica das leveduras, e consequentemente, ocorre a formação de compostos aromáticos.

A ação fermentativa das leveduras depende de diversos parâmetros, quer ao nível da seleção da estirpe quer das condições de fermentação, o que torna pertinente a análise do seu desempenho durante o processo fermentativo.

Nesse sentido, foram realizados ensaios conduzidos com as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* Safale 04, *Saccharomyces cerevisiae* Blanche, *Saccharomyces cerevisiae* Saflager 23, *Pichia kluyveri* ISA 1441, *Metschnikowia pulcherrima* ISA 1808 e *Saccharomycodes ludwigii* ISA 1886 nos diferentes estilos de mostos (*Stout*, *Weissbier* e *Dunkel*), com o objetivo de obter cervejas com perfis sensoriais distintos e cervejas artesanais diferenciadas.

Ao longo dos ensaios deu-se particular importância a aspetos relacionados com a prestação das estirpes, quer em termos de número de células viáveis e na sua viabilidade relativa, isto é, na relação entre as células viáveis e células totais presentes em cada ensaio, bem como ao seu desempenho fermentativo em termos de consumo de açúcares e produção de produtos de fermentação.

As fermentações realizadas nos mostos *Stout* e *Weissbier* tiveram duração de sete dias, tendo sido inoculada a estirpe comercial, de acordo com o estilo (*S. cerevisiae* S-04 e *Blanche*, respetivamente), ao início do segundo dia de fermentação, de modo a garantir a fermentação completa dos açúcares. Nos ensaios realizados em mosto *Dunkel*, a estirpe comercial corresponde a *S. cerevisiae* S-23, e o processo fermentativo teve uma duração de 14 dias, com a co-inoculação a ser iniciada ao quarto dia de fermentação.

A inoculação das estirpes, quer no início da fermentação, como no momento da co-inoculação com a estirpe comercial foi realizada na gama de valores de 10^6 cel/mL num volume de mosto final de 800 mL. A introdução do co-inóculo representa apenas cerca de aproximadamente 1% do total de células, o que significa que não exercerá influência considerável nos valores dos diferentes ensaios, logo após a inoculação.

3.1. Caracterização das estirpes selecionadas

O processo fermentativo depende da atividade metabólica das leveduras, principalmente da sua capacidade de consumir os açúcares disponíveis nos meios de crescimento.

Para a realização deste estudo foram selecionadas três espécies não-convencionais (*Pichia kluyveri*, *Metschnikowia pulcherrima* e *Saccharomycodes ludwigii*), e por sua vez, foram obtidas diretamente do banco de leveduras do ISA, duas estirpes de cada. Deste modo, e no sentido de confirmar a autenticidade das diferentes estirpes, estas foram testadas quanto à sua capacidade

de fermentação, em diferentes meios de cultura, nomeadamente, em YPD (extrato de levedura, peptona e dextrose), YPM (extrato de levedura, peptona e maltose) e YPD com ciclohexamida (Tabela 6). As leveduras foram suspensas nos diferentes meios, no estado líquido, e submetidas a incubação durante 120 horas, a uma temperatura a 28° C e com agitação orbital de 170 rpm.

A ciclohexamida é um antibiótico que, na concentração de 10 mg/L, é ideal para criar um meio seletivo, uma vez que inibe o crescimento de espécies de *Saccharomyces* (Garcia, 2017; Morneau *et al.*, 2011).

Tabela 6 – Caracterização das diferentes estirpes selecionadas, com base na capacidade de crescimento em diferentes meios.

Estirpes Seleccionadas	Código ISA	Origem	Meios de crescimento		
			YPD	Maltose	YPD + Ciclohexamida
Controlo			-	-	-
<i>P. kluyveri</i>	1441*	PYCC 4377	+	-	-
	2333	47	+	-	-
<i>M. pulcherrima</i>	1218	DBVPG 2704	+	+	-
	1886*	CECT 10450	+	+	-
<i>S. ludwigii</i>	1808*	PYCC 4830	+	-	-
	1809	PYCC 2726	+	-	-

Legenda: Não se verificou crescimento (-) ; Ocorreu crescimento (+); Estirpe selecionada (*)

Os resultados das análises estão de acordo com o esperado e descrito em Kurtzman e colaboradores (2011) e em Francesco e colaboradores (2015), uma vez que, se verificou a capacidade de todas as estirpes crescerem em glucose, tal como, o facto de não se verificar crescimento em meio de maltose nos ensaios inoculados com a estirpe *P. kluyveri* e *S. ludwigii*. Os resultados obtidos permitiram assim, a seleção das estirpes a serem utilizadas nos ensaios, nomeadamente a ISA 1441, ISA 1886 e a ISA 1808, identificadas na Tabela 6 com *.

3.2. Caracterização dos estilos de cervejas

De acordo com Garcia (2017), os estilos de cerveja foram selecionados com base em três critério, a complexidade da mistura de maltes, a influência do lúpulo na componente aromática do produto final, e popularidade de cada estilo.

Recorreu-se, portanto, a receitas básicas, que conseguissem espelhar bem o estilo de cerveja, que não comprometem a atividade da levedura, e que, ao mesmo tempo a influência do malte e lúpulo no *flavour* e aroma do produto final não fossem demasiado proeminentes. Neste sentido, e de forma a incluir os principais dois tipos de fermentação, foram selecionados dois estilos de cerveja *Ale* (alta fermentação): *Stout* (coloração castanha-escura) e *Weissbier* (coloração amarela esbranquiçada), e um estilo de cerveja *Lager* (baixa fermentação): *Dunkel* (coloração âmbar/castanha escura).

Caracterização dos mostos utilizados nos diferentes ensaios

A fermentação é um processo que depende do metabolismo das leveduras, isto é, está diretamente relacionado com a eficiência do consumo de açúcares, assim como da produção de etanol, glicerol, entre outros metabolitos secundários.

Por sua vez, as condições do mosto influenciam significativamente o crescimento, e o metabolismo das leveduras, devendo ser adequadas às necessidades dos microrganismos, quer ao nível da disponibilização dos nutrientes, quer ao nível dos parâmetros físico-químicos. A composição química dos mostos produzidos e utilizados nos diferentes ensaios encontra-se na Tabela 7.

Tabela 7 – Caracterização dos mostos utilizados nos diferentes ensaios.

		<i>Stout</i>	<i>Weissbier</i>	<i>Dunkel</i>
Turvação	Abs. 640 nm	0,90 ± 0,03	1,42 ± 0,00	0,37 ± 0,02
Proteína	mg/L	118,60 ± 0,00	135,83 ± 0,00	249,01 ± 0,00
pH		5,04 ± 0,01	5,30 ± 0,10	5,04 ± 0,04
°Brix		7,38 ± 0,09	13,45 ± 0,09	10,48 ± 0,05
Densidade	mg/mL	1,02 ± 0,00	1,50 ± 0,00	1,00 ± 0,00
Maltotriose		1,67 ± 0,00	2,60 ± 0,08	4,11 ± 0,00
Maltose	% (m/v)	1,74 ± 0,00	7,24 ± 0,11	11,63 ± 0,00
Glucose		4,17 ± 0,00	1,64 ± 0,09	1,74 ± 0,00

3.3. Ensaios de fermentação com mosto tipo *Dunkel*

A cerveja *Dunkel* é um estilo de cerveja de "baixa fermentação", caracterizada pela sua cor acastanhada escura e cuja estirpe comercial habitualmente usada é *S. cerevisiae* *Saflager* S-23. O processo de fermentação teve uma duração de 14 dias, a uma temperatura de 15° C nas primeiras 48 horas, e de 12° C durante o restante tempo. No decorrer da fermentação procedeu-se à avaliação da capacidade fermentativa das diferentes estipes em estudo, com base em parâmetros microbiológicos e físico-químicos.

3.3.1. Análise Microbiológica

No sentido de avaliar o estado fisiológico das células das várias estirpes ao longo do processo fermentativo determinou-se a variação de viabilidade das células, quer em termos de células com capacidade de multiplicação (expressa em UFC/mL), quer de células metabolicamente ativas (expressa em percentagem relativa do número destas células face ao número de células total), uma vez que tal traduzirá a fração de células que está efetivamente a fermentar.

Com o arranque da fermentação, verificou-se uma distinção entre os comportamentos das diferentes estirpes ao nível da capacidade de multiplicação das leveduras (Figura 10). Nas primeiras 24 horas de fermentação só se verificou o arranque do crescimento nas estirpes não convencionais, correspondendo a uma subida do número de células viáveis e cultiváveis nos diferentes ensaios (Figura 10A).

No ensaio conduzido com *S. cerevisiae* Saflager S-23, verificou-se que, a estirpe só inicia a fase de crescimento exponencial após o primeiro dia de fermentação, seguindo-se um aumento do número de células viáveis cultiváveis de forma gradual até atingir, com a entrada no terceiro dia de fermentação, $5,95 \times 10^8$ cel/mL células viáveis e cultiváveis. Após atingir estes valores verificou-se uma diminuição acentuada da capacidade de multiplicação ($2,43 \times 10^6$ cel/mL), seguido de um aumento dos valores, como resultado da introdução do co-inóculo, que se mantém até ao nono dia, e que poderá ser atribuído ao balanço com a levedura comercial introduzida e que deverá corresponder à maior fração de células viáveis e cultiváveis.

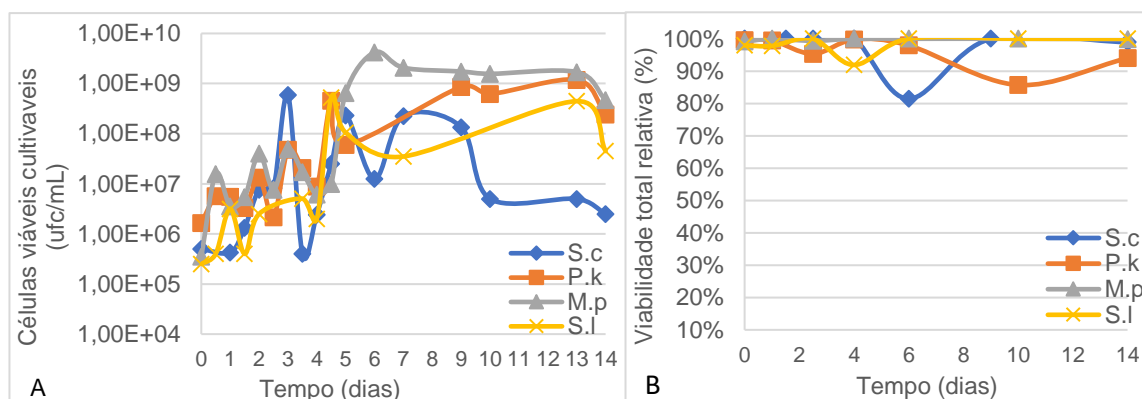


Figura 10 - Viabilidade das estirpes durante a fermentação em mosto Dunkel. A) Curvas de crescimento das leveduras, representando a evolução das células viáveis cultiváveis ao longo do processo de fermentação. B) Variação da viabilidade relativa nos ensaios fermentativos. Ensaio inoculado inicialmente com *S. cerevisiae* Saflager (S.c); *P. kluyveri* (P.k); *M. pulcherrima* (M.p); *S. ludwigii* (S.l).

Com base a evolução do comportamento microbiano do ensaio com *P. kluyveri*, é possível destacar dois momentos, ao segundo dia e ao décimo dia fermentativo, onde que se verificou a diminuição da viabilidade total relativa das leveduras e simultaneamente uma redução do número de UFC/mL do ensaio (Figura 10A), levando a colocar a hipótese de neste caso ter havido redução do número de células viáveis cultiváveis não só de *P. kluyveri* mas também da estirpe comercial.

No que respeita o ensaio inoculado com *M. pulcherrima*, face à capacidade de multiplicação das leveduras, observa-se um aumento progressivo do número de UFC/mL durante o período inicial até ao momento da introdução da estirpe comercial, atingindo o seu valor máximo ao fim de três dias ($4,90 \times 10^7$ UFC/mL). A partir deste ponto observou-se uma diminuição progressiva da população até à co-inoculação com *S. cerevisiae* Saflager S-23. Com a continuação do processo fermentativo, a densidade populacional aumentou até $4,20 \times 10^9$ cel/mL, tendendo a estabilizar entre valores na ordem de grandeza de 10^9 cel/mL, maioritariamente devido ao domínio da estirpe comercial.

A variação do número de células viáveis cultiváveis do ensaio conduzido com *S. ludwigii*, apresenta semelhanças ao ensaio inoculado com *P. kluyveri*, registando uma diminuição acentuada da densidade populacional ao fim do quarto dia fermentativo ($2,50 \times 10^6$ cel/mL), que coincidiu com uma perda de viabilidade total relativa das leveduras, no entanto, com a introdução do co-inóculo verificou-se um aumento dos valores em ambos os parâmetros (Figura 10B).

Estes resultados vão ao encontro do descrito por outros autores para as fermentações alcoólicas em co-inoculação, que referem que é frequente o domínio das estirpes comerciais e/ou estirpes selvagens de *S. cerevisiae* Saflager S-23 nestas situações (Albergaria *et al.*, 2010).

Variação do valor de turvação ao longo da fermentação

A turvação da cerveja (determinada com base na densidade ótica a 640nm) durante a fermentação, depende do número total de células (independentemente de serem viáveis, inviáveis ou células mortas) (Willey *et al.*, 2008) e da ação enzimática (amilases, β -glucanases e proteases) (Steiner *et al.*, 2010). Ao longo da fermentação é expectável que, por um lado, a turvação do mosto aumente em consequência do aumento da população de leveduras, mas por outro diminua devido à ação enzimática, sendo a turvação total o resultado deste balanço.

Nas primeiras horas de fermentação, foi possível distinguir dois comportamentos diferentes entre os ensaios conduzidos em mosto *Dunkel*. Nos ensaios de *S. cerevisiae* Saflager S-23 e de *S. ludwigii* verificou-se um aumento dos valores turvação, ao contrario do que ocorre nos ensaios de *P. kluyveri* e *M. pulcherrima* (Figura 11). Esta variação inicial dever-se-á maioritariamente à ação enzimática, uma vez que o aumento da população neste período pode não ser suficientemente elevado para contrabalançar a redução/deposição de proteínas e β -glucanos.

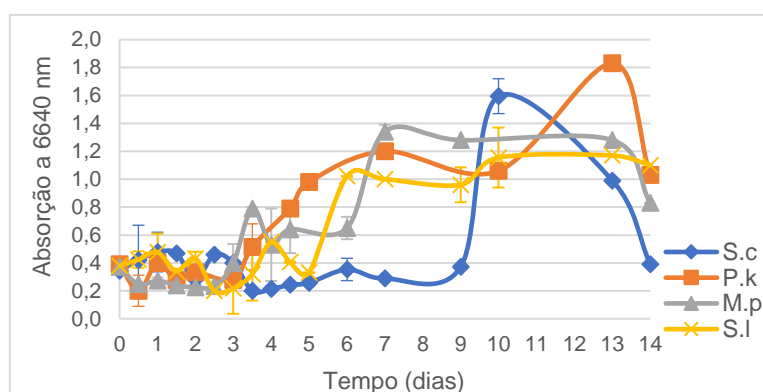


Figura 11 - Evolução da turvação durante a fermentação nos diferentes ensaios em mosto *Dunkel*. Ensaios inoculados com *S. cerevisiae* Saflager (S.c); *P. kluyveri* (P.k); *M. pulcherrima* (M.p); *S. ludwigii* (S.l).

Analisando a evolução da turvação caso a caso, observou-se que o ensaio com *S. cerevisiae* Saflager S-23, apresentou o valor mais baixo (0,20) no decorrer do terceiro dia de fermentação, que coincide com uma diminuição considerável da população microbiana nesse período (Figura 10A). Com a introdução do co-inóculo ao quarto dia, e até ao nono dia de fermentação, os valores de turvação deste ensaio permaneceram sem sofrer alterações consideráveis.

Nos ensaios inoculados com *P. kluyveri*, *M. pulcherrima* e *S. ludwigii*, a introdução do co-inóculo conduziu a um aumento dos valores de turvação que se mantêm, de uma forma geral, ao longo do restante período de fermentação. Com a introdução da estirpe comercial, o ensaio conduzido com *S. ludwigii* destacou-se dos restantes por apresentar uma ligeira diminuição nas primeiras 24 horas em que o processo decorre por co-inoculação.

Com a continuação do processo fermentativo, nos ensaios de *M. pulcherrima* e *S. ludwigii* os valores de turvação tenderam a estabilizar, no entanto, com a entrada no período final de fermentação é comum a todos os ensaios uma diminuição dos valores de turvação, que coincidiu com a diminuição do número de células metabolicamente ativas.

No final do ensaio, *S. cerevisiae* Saflager S-23 apresentou um valor de turvação muito próximo do valor no momento da co-inoculação (0,39), contrariamente ao que aconteceu nos ensaios de co-inoculação com *P. kluyveri*, *S. ludwigii* e também, com *M. pulcherrima*, embora de forma menos visível, onde se verificou uma maior diferença entre os valores ao quarto dia e no final da fermentação. Estas diferenças coincidiram com os valores obtidos para as células totais dos quatro ensaios, que no caso de *S. cerevisiae* Saflager S-23 é uma ordem de grandeza menor que nos outros três ensaios.

Apesar da ordem de grandeza dos valores obtidos para as células totais no final da fermentação ser similar entre os ensaios inoculados com estirpes não-convencionais (nomeadamente, entre $1,2 \times 10^7$ para *P. kluyveri*, $3,2 \times 10^7$ para *M. pulcherrima*, , $2,99 \times 10^7$ para *S. ludwigii*), não existe relação entre o número de células existentes e as diferenças que se verificam nos valores finais de turvação. As disparidades entre ensaios podem dever-se a diferenças no tamanho das células de cada estirpe (Figura 12).

A turvação é um dos primeiros parâmetros de qualidade a ser avaliado pelo consumidor na primeira avaliação visual, no entanto, uma cerveja turva pode ser um defeito ou uma qualidade dependendo da expectativa do consumidor. Os resultados de turvação obtidos nos diferentes ensaios vão ao encontro do desejado, uma vez que, no caso da cerveja de tipo *Dunkel* pretende-se uma cerveja mais límpida.

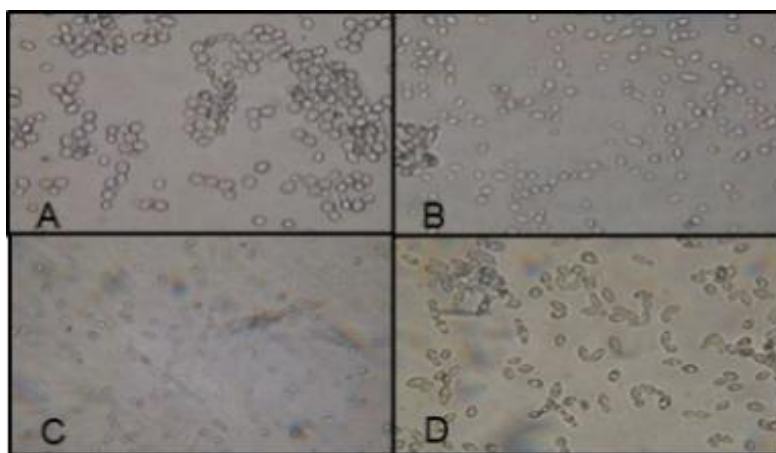


Figura 12 – Aspeto microscópico das diferentes estirpes (ampliação 400x): *S. cerevisiae* (A); *P. kluyveri* (B); *M. pulcherrima* (C); *S. ludwigii* (D).

Variação da concentração de proteína ao longo da fermentação

Um outro parâmetro determinado ao longo da fermentação foi a concentração de proteína solúvel que poderá estar relacionado com fenómenos de autólise das leveduras, uma vez que estes implicam a libertação do conteúdo intracelular, e a sua correlação com o número de células metabolicamente ativas.

Nas primeiras 48 horas do processo fermentativo, os ensaios inoculados com *S. cerevisiae* Saflager S-23 e *M. pulcherrima*, destacaram-se por apresentar uma descida dos valores de concentração da proteína em solução, sendo mais acentuada neste último, contrariamente ao que se verificou no ensaio com *P. kluyveri*, que se mantém relativamente estáveis até ao momento em que ocorreu a introdução do co-inóculo (Figura 13). No caso de *S. ludwigii* e *S. cerevisiae* Saflager S-23, ao fim de 48 horas observou-se um aumento da concentração de proteína solúvel.

Com a introdução ao segundo dia da estirpe comercial *S. cerevisiae* Saflager S-23, os diferentes ensaios conduzidos com as estirpes não convencionais registaram uma ligeira subida da concentração de proteínas, no entanto, os valores tenderam a estabilizar até ao final da fermentação, tendo sido o ensaio conduzido com a estirpe *M. pulcherrima* aquele que terminou o processo com o menor valor de concentração de proteína (Tabela 8).

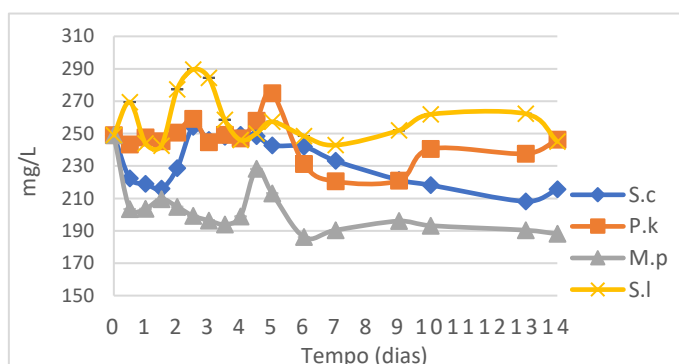


Figura 13 - Evolução da concentração de proteína solúvel durante a fermentação nos diferentes ensaios em mosto Dunkel. Ensaios inoculados com *S. cerevisiae* Saflager (S.c); *P. kluyveri* (P.k); *M. pulcherrima* (M.p); *S. ludwigii* (S.l).

Tabela 8 –Concentração de proteína no início e fim da fermentação em mosto Dunkel.

Estirpe	Tempo	Concentração (mg/L)	
		Início	Fim
<i>S. cerevisiae</i> S-23		249,01	215,56
<i>P. kluyveri</i>		249,01	246,19
<i>M. pulcherrima</i>		249,01	188,09
<i>S. ludwigii</i>		249,01	245,13

Os resultados obtidos nos diferentes ensaios vão ao encontro do expectável, uma vez que, durante a fermentação é esperado que o conteúdo de proteínas proveniente do malte não apresenta alterações, contudo uma prolongada exposição a valores de pH baixos poderá levar à precipitação de uma pequena quantidade de complexos de proteínas e polifenóis que são separados pela ação enzimática das leveduras (Lewis e Bamforth, 2006) podendo este efeito ser contrabalançado pela autólise das células, mais acentuada em *S. cerevisiae*.

Comparando os valores da proteína solúvel com os valores de viabilidade celular e turvação, não é possível estabelecer uma correlação entre estes parâmetros, uma vez que o aumento da proteína total solúvel não corresponde a uma diminuição do número de células viáveis, nem a diminuição ou manutenção de proteína corresponde a uma manutenção do número de células viáveis ou um aumento da turvação.

3.3.2. Análise dos parâmetros físicos e químicos

A fermentação resulta da capacidade das leveduras realizarem processos metabólicos, cujas reações bioquímicas dependem da aptidão destas para consumirem os açúcares disponíveis e sintetizarem etanol, glicerol entre outros metabolitos secundários que, por sua vez, são diretamente dependentes das condições físico-químicas do mosto.

Variação do valor de pH ao longo da fermentação

O pH do mosto é influenciado pelas múltiplas dissociações e associações que ocorrem entre ácidos fracos e bases conjugadas durante a fermentação. Ou seja, este parâmetro está diretamente relacionado com a presença de aminoácidos e os péptidos do mosto que, contrariamente aos açúcares, possuem carga iónica (Lewis e Bamforth, 2006). Para além disso, está também relacionado com a capacidade das células através da ação da ATPase expulsarem H^+ , muito elevada no caso de *S. cerevisiae* (Bolotin-Fukuhara, 2006).

Os resultados obtidos para os diferentes ensaios do mosto *Dunkel* vão ao encontro do esperado, uma vez que se verificou um menor valor de pH no final do processo fermentativo em relação ao valor inicial. A variação deste parâmetro durante a fermentação é resultado do consumo das reservas do mosto e da produção de metabolitos secundários, tais como ácidos fracos (Coote e Kirsop, 1976; O'Rourke, 2002).

A evolução do pH durante os primeiros dias da fermentação evidencia dois comportamentos distintos entre os diferentes ensaios (Figura 14). O mosto fermentado com *S. cerevisiae* Saflager S-23 sofreu uma diminuição rápida do pH, contrariamente às estirpes não comerciais. Nos ensaios com *P. kluyveri* e *M. pulcherrima*, a descida dos valores de pH observou-se claramente após a inoculação da estirpe comercial, com um comportamento muito semelhante ao que havia sido observado no ensaio apenas com *S. cerevisiae*, podendo ser atribuído à presença desta estirpe. No ensaio com *S. ludwigii* essa diminuição não se verificou de forma tão evidente. A partir desse momento, e até ao final da fermentação, os diferentes ensaios tenderam a estabilizar terminando o processo com valores bastante semelhantes entre si (Tabela 9).

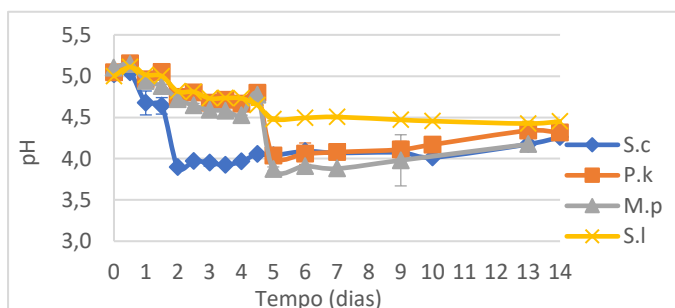


Figura 14 – Evolução do pH durante a fermentação nos diferentes ensaios em mosto *Dunkel*. Ensaios inoculados com *S. cerevisiae* Saflager (S.c); *P. kluyveri* (P.k); *M. pulcherrima* (M.p); *S. ludwigii* (S.l).

Tabela 9 – Relação entre os valores de pH, no início e fim da fermentação em mosto *Dunkel*.

Estirpe	Tempo	
	Início	Fim
<i>S. cerevisiae</i> S-23	5,02	4,26
<i>P. kluyveri</i>	5,05	4,32
<i>M. pulcherrima</i>	5,10	4,17
<i>S. ludwigii</i>	5,00	4,45

Açúcares Redutores

De forma a efetuar uma análise preliminar e rápida aos açúcares fermentescíveis presentes no mosto ao longo da fermentação realizou um teste usando tiras Teste Keto-Diabur-5000. Esta análise permite estimar a quantidade de glucose presente nas amostras em poucos minutos.



Figura 15 – Resultados do Teste Keto-Diabur 5000, nos diferentes tempos de fermentação para o ensaio com *S. cerevisiae* Saflager S-23.

Os resultados obtidos através deste método (Figura 15), indicaram que a concentração de glucose presente está abaixo dos níveis de deteção do método, ou seja são inferiores a 0,1% (m/v) (Roche Diagnostics, 2004) mesmo no início da fermentação onde estes valores eram seguramente mais elevados, o que demonstrou claramente um efeito de interferência da matriz no método utilizado pondo em causa a fiabilidade/viabilidade da sua utilização.

Variação dos valores de °Brix ao longo da fermentação

O °Brix mede os sólidos totais solúveis presentes no mosto (por exemplo: açúcares, ácidos orgânicos e pectinas), como tal, esta análise permite avaliar a eficiência da ação enzimática e o consumo de açúcares ao longo da fermentação. O tempo zero da fermentação, equivale ao valor de °Brix no mosto não fermentado.

A evolução deste parâmetro, representada na Figura 16, demonstrou que a introdução da estirpe comercial *S. cerevisiae* Saflager S-23 ao quarto dia da fermentação, influenciou o comportamento das estirpes.

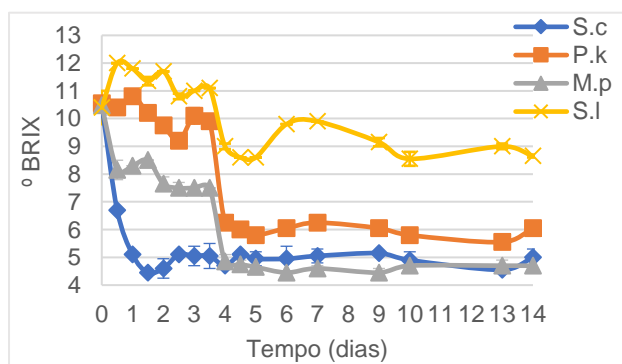


Figura 16 - Evolução do °Brix durante a fermentação nos diferentes ensaios em mosto Dunkel. Ensaios inoculados com *S. cerevisiae* Saflager (S.c); *P. kluyveri* (P.k); *M. pulcherrima* (M.p); *S. ludwigii* (S.l).

Com o decorrer da fermentação, o metabolismo das leveduras conduziu ao consumo dos açúcares. Posto isto, os resultados obtidos neste parâmetro vão ao encontro do esperado, uma vez que, nos diferentes ensaios se verificou diminuição do °Brix entre o início e o fim da fermentação.

Nas primeiras 24 horas de fermentação, o ensaio inoculado com *S. cerevisiae* Saflager S-23 apresentou uma diminuição acentuada dos valores, para aproximadamente 5 °Brix, nos quais se manteve até ao fim da fermentação.

Os ensaios conduzidos com as estirpes *P. kluyveri* e *M. pulcherrima*, no período inicial registaram uma ligeira descida dos valores, apesar de mais acentuada na segunda estirpe. No entanto, ao quarto dia de fermentação, com a introdução da estirpe comercial, os valores de °Brix diminuíram de forma acentuada. Com a continuação do processo fermentativo, os valores não sofreram grandes alterações. O padrão de variação do °Brix, é similar em ambas as estirpes. No entanto, dado que no ensaio conduzido com a estirpe *P. kluyveri* os valores eram mais elevados, a redução observada foi também superior à verificada no ensaio com *M. pulcherrima*, o que pode ser atribuído ao facto de, no último caso, o ponto de partida no momento da co-inoculação ser inferior.

Por sua vez, o ensaio inoculado com *S. ludwigii* correspondeu ao ensaio cujo comportamento apresentou menor variação ao longo do processo fermentativo, apesar de se ter registado uma descida considerável com a introdução do co-inóculo. Este ensaio terminou a fermentação com o maior valor de °Brix.

Os resultados obtidos indicam que na generalidade as fermentações poderiam não ter sido completas, existindo ainda açúcares solúveis no mosto, o que levaria a pensar que deveríamos prolongar o tempo de fermentação. No entanto, os resultados obtidos posteriormente na determinação dos açúcares por HPLC mostraram que, de facto, no final da fermentação já não existiam açúcares fermentescíveis, indicando que os valores de °Brix obtidos resultam de outros compostos solúveis presentes no mosto.

Variação da densidade ao longo da fermentação

A densidade do mosto depende do tipo e quantidade de compostos em solução/suspensão (sólidos em suspensão e dissolvidos e etanol). Ao longo da fermentação é expectável que este parâmetro tenda a diminuir, como consequência do aumento do número de células, do consumo de açúcares, da produção de dióxido de carbono e ainda, pelo facto de que, o álcool que se forma durante esta etapa tem uma densidade inferior à da água (Briggs *et al.*, 2004). O maior ou menor peso de cada um destes factores varia de matriz para matriz.

No que respeita a evolução do parâmetro da densidade (Figura 19), com o arranque da fermentação, a variação da densidade ocorreu de forma espectável no caso de *S. cerevisiae* S-23 e *M. pulcherrima*, uma vez que, tal como descrito em Briggs *et al.* (2004), os valores iniciais de densidade baixaram, refletindo a redução do °Brix observado para estas estirpes (Figura 17). No caso de *P. kluyveri*, à semelhança do observado para o °Brix não houve uma redução significativa da densidade, que só diminui após quatro dias de fermentação, ou seja, com a inoculação de *S. cerevisiae* S-23.

Em relação aos valores obtidos para *S. ludwigii*, observou-se um aumento inesperado da densidade, muito embora concordante com a menor variação do °Brix observado para esta estirpe. No final do processo, e à semelhança do observado para o °Brix, todos os ensaios de *S. cerevisiae* S-23, *P. kluyveri* e *M. pulcherrima* apresentaram valores muito próximos entre si, sendo o valor mais elevado observado em *S. ludwigii*. Os resultados obtidos indicam que existe um balanço entre

o crescimento microbiano, a densidade das células e a quantidade de compostos em solução/suspensão, nomeadamente o etanol que contribui para diminuição da densidade e o glicerol que contribui para o seu aumento.

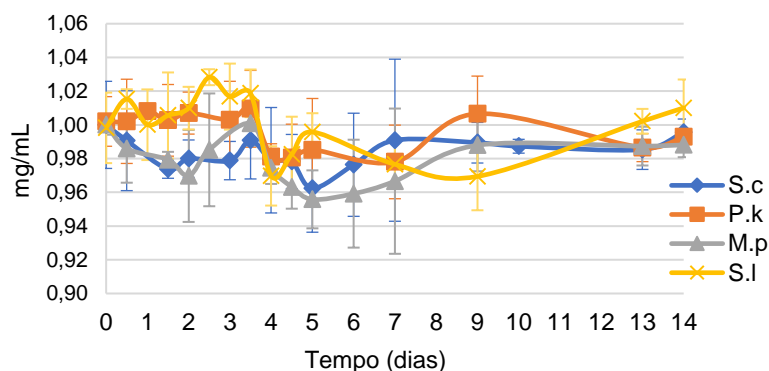


Figura 17 – Evolução da densidade durante a fermentação nos diferentes ensaios em mosto *Dunkel*. Ensaios inoculados com *S. cerevisiae* Saflager (S.c); *P. kluyveri* (P.k); *M. pulcherrima* (M.p); *S. ludwigii* (S.l).

Análise dos ensaios por HPLC

De forma a avaliar com maior grau de exatidão o consumo de açúcares e produção de metabolitos ao longo da fermentação analisaram-se por HPLC as amostras recolhidas (Figura 20).

Com base na avaliação da composição dos diferentes ensaios e na sua variação ao longo da fermentação, ou seja, na análise do perfil de consumo de açúcares e de produção de etanol e glicerol, foi possível constatar que no arranque do processo a maltose era o açúcar predominante (11,63% m/v), seguido da maltotriose (4,11% m/v) e da glucose (1,74% m/v), o que vai ao encontro do descrito em Walker e Stewart (2016). No que respeita ao consumo dos açúcares, foi comum aos diferentes ensaios o facto da glucose ser o primeiro açúcar a atingir o esgotamento, ao fim de quatro dias de fermentação, ou seja anterior à co-inoculação com *S. cerevisiae* S-23. Tal indica que este açúcar foi consumido maioritariamente pela estirpe inicialmente inoculada, sendo *S. cerevisiae* S-23 aquela que mais rapidamente consumiu este açúcar.

Nos ensaios é notório que o consumo de maltose e maltotriose ocorreu maioritariamente em duas fases, uma primeira entre o início e as primeiras 24h e uma segunda após a inoculação da estirpe de *S. cerevisiae* Saflager S-23 (Figura 18A). Dado que *P. kluyveri* (Figura 18B) e *M. pulcherrima* (Figura 18C) são espécies incapazes de fermentar maltose, a primeira fase de consumo deverá corresponder a uma fase de assimilação da maltose em presença de oxigénio, enquanto a população não atingiu ainda valores muito elevados, o que coincide com a ausência de produção de etanol neste período. Resultado espectável dado a incapacidade de fermentar estes açúcares descrita para estas espécies (Kurtzman, 2011b). Após o quarto dia, o consumo de maltose resultou da fermentação por *S. cerevisiae* Saflager S-23, coincidindo com o aumento mais significativo da concentração de etanol em simultâneo com a ausência de glucose.

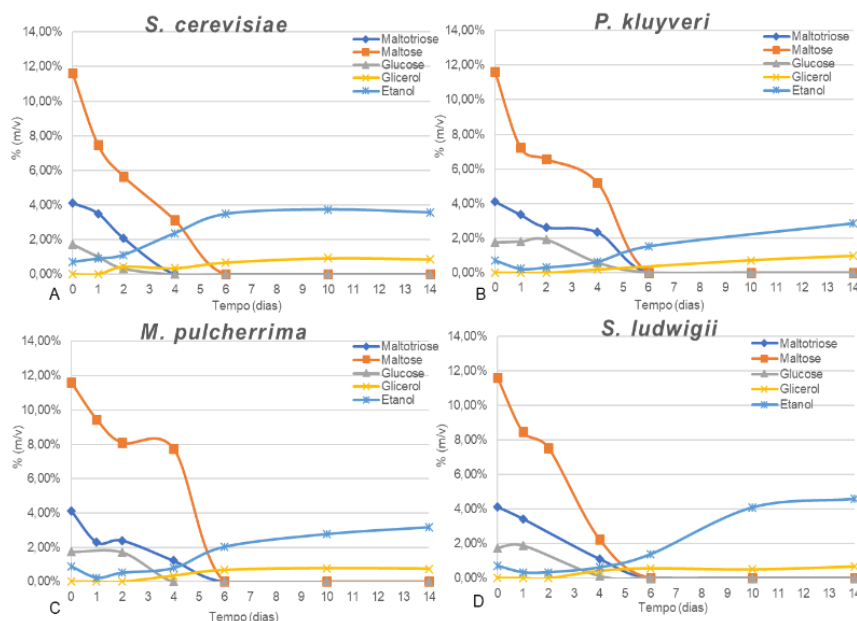


Figura 18 - Consumo de açúcares e de produção de etanol e glicerol ao longo da fermentação nos diferentes ensaios em mosto *Dunkel*. Ensaios inoculados com *S. cerevisiae* Saflager (A); *P. kluyveri* (B); *M. pulcherrima* (C); *S. ludwigii* (D).

Entre os quatro ensaios realizados verificaram-se dois comportamentos diferentes em relação à produção de etanol. No ensaio inoculado com a estirpe *S. cerevisiae* Saflager S-23 a concentração de etanol aumentou desde o momento inicial até ao sexto dia de fermentação onde tende a estabilizar, o que coincidiu com o esgotamento total dos açúcares mais importantes. Nos ensaios conduzidos com estirpes não-convencionais não se verificou alterações na concentração deste composto até ao momento da co-inoculação, ao quarto dia fermentativo, momento a partir do qual a concentração aumentou consideravelmente. O ensaio conduzido com a estirpe *S. ludwigii* (Figura 18D) destacou-se por terminar o processo fermentativo com a maior concentração de etanol (4,59% m/v), enquanto que, os restantes ensaios registaram 3,57% (m/v) (*S. cerevisiae* Saflager S-23), 2,87 % (m/v) (*P. kluyveri*) e 3,19% (m/v) (*M. pulcherrima*). Este resultado vem ao encontro do esperado, uma vez que, *P. kluyveri* e *M. pulcherrima* são leveduras essencialmente não-fermentativas (Moller *et al.*, 2002).

No que respeita à síntese de glicerol, de uma forma geral, os ensaios não apresentaram concentrações elevadas. No final da fermentação destacou-se o ensaio com *P. kluyveri* por apresentar a maior concentração de glicerol, correspondendo a 0,97% da sua composição, por oposição ao ensaio com *S. ludwigii* que terminou a fermentação com 0,67% de glicerol. Estes resultados vêm ao encontro dos resultados esperados com base na concentração de etanol final para cada um destes ensaios: menor concentração de etanol/menor concentração de glicerol e maior concentração de etanol/menor concentração de glicerol, em resultado do desvio parcial da fonte de carbono e energia da produção de etanol para produção de glicerol (Goold *et al.*, 2017). Para todas as estirpes, e tal como esperado, a concentração de etanol foi sempre superior à concentração de glicerol produzida, permitindo à levedura manter um certo aporte energético (Walker e Stewart, 2016).

A síntese de glicerol e etanol é uma consequência do processo fermentativo, sendo que a facilidade com que as estirpes realizam esta síntese depende de diversos fatores, entre eles a individualidade de cada estirpe inoculada nos diferentes ensaios (Scanes *et al.*, 1998).

3.4. Ensaios de fermentação com mosto tipo *Weissbier*

Das duas cervejas de estilo *Ale* produzidas, optou-se por estudar duas com características muito diferenciadas, uma cerveja tipo *Stout* e uma cerveja tipo *Weissbier*.

O estilo de cerveja *Weissbier* é caracterizado pela sua cor âmbar, frescura, por apresentar alta carbonatação, diferenciando-se dos restantes estilos pela particularidade de na sua receita incluir trigo maltado. Estas cervejas apresentam um *flavour* equilibrado e suave, com notas aromáticas de banana e cravinho (Strong e England, 2015).

3.4.1. Análise Microbiológica

Tal como no caso de *Dunkel*, ao longo do processo fermentativo os diferentes ensaios foram submetidos à avaliação do comportamento celular e do estado fisiológico das diferentes estirpes, tendo por base dois estudos complementares, a variação do número de células viáveis e a contagem do número total de células viáveis (Figura 19).

Ao longo do processo fermentativo, e no que respeita o crescimento populacional de leveduras, os diferentes ensaios apresentaram, na generalidade, comportamentos distintos (Figura 19A).

Ao fim do primeiro dia do processo de fermentação, os ensaios conduzidos com as estirpes *S. cerevisiae Blanche* (estirpe comercial), *M. pulcherrima* e *S. ludwigii* apresentaram um aumento da densidade populacional (Figura 19A), e simultaneamente, um aumento da viabilidade relativa, menos acentuado no caso do ensaio com a estirpe comercial (Figura 19B). Por outro lado, no ensaio com *P. kluyveri*, verificou-se que com o arranque da fermentação, e até ao momento da introdução do co-inóculo, ocorreu uma diminuição do número de células viáveis e cultiváveis assim como, uma diminuição considerável da viabilidade total relativa das células.

Estas variações indicam a ausência de necessidade de um período de adaptação das leveduras às condições do mosto de *Weissbier* onde foram inoculadas, exceto no ensaio conduzido com a estirpe *P. kluyveri*, a diminuição contínua da viabilidade total relativa dever-se-á a uma incapacidade desta estirpe se adaptar às condições do processo de fermentação.

Nos diferentes ensaios de estirpes não convencionais, ocorreu um aumento considerável da densidade populacional, muito por consequência da multiplicação da nova estirpe introduzida na fermentação, contrabalançando a perda de células da estirpe inicial. Para qualquer dos ensaios, este valor não poderá ser atribuído ao inóculo inicial de *S. cerevisiae Blanche* que foi adicionado, uma vez que, este representa apenas cerca de aproximadamente 1% do total de células.

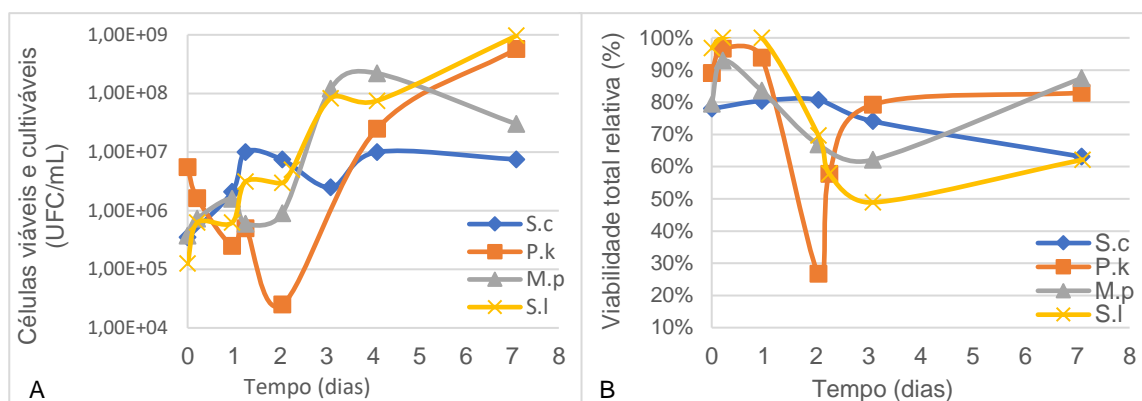


Figura 19- Viabilidade das estirpes durante a fermentação em mosto *Weissbier*. A) Curvas de crescimento das leveduras, representando a evolução das células viáveis cultiváveis ao longo do processo de fermentação. B) Variação da viabilidade relativa ao longo dos ensaios fermentativos. Ensaios inicialmente inoculados com *S. cerevisiae* Blanche (S.c); *P. kluyveri* (P.k); *M. pulcherrima* (M.p); *S. ludwigii* (S.l).

Com a aproximação do final do processo, principalmente a partir do quarto dia, o ensaio com *S. cerevisiae* estabilizou, registrando os valores mais baixos do número de células com capacidade de multiplicação ($7,5 \times 10^6$ cel/mL). Neste mesmo período, registou-se semelhanças no comportamento entre os ensaios de *P. kluyveri* e *S. ludwigii*, ou seja, verificou-se um aumento da densidade populacional em ambos os ensaios ($5,75 \times 10^8$ e $9,65 \times 10^8$ cel/mL, respetivamente).

Variação do valor da turvação ao longo da fermentação

No sentido de avaliar o número total de células nos diferentes ensaios e a ação enzimática durante a fermentação, determinaram-se os valores de turvação (DO 640 nm) dos quatro ensaios em diferentes pontos ao longo do processo.

Tal como demonstra a Figura 20, os diferentes ensaios apresentaram comportamentos bastante distintos entre si, em relação à variação da turvação. Com o arranque da fermentação, a turvação diminuiu nos diferentes ensaios, mas em momentos dispares. O ensaio inoculado com a estirpe *S. cerevisiae* Blanche registou um aumento de turvação nas primeiras horas do processo, seguindo-se uma diminuição acentuada dos valores, contrariamente ao que ocorreu nos restantes ensaios. Neste período inicial os ensaios conduzidos com a estirpe *P. kluyveri*, *M. pulcherrima* e *S. ludwigii* registaram uma diminuição dos valores de turvação, apesar de ser muito menos acentuada no caso do ensaio com *P. kluyveri*.

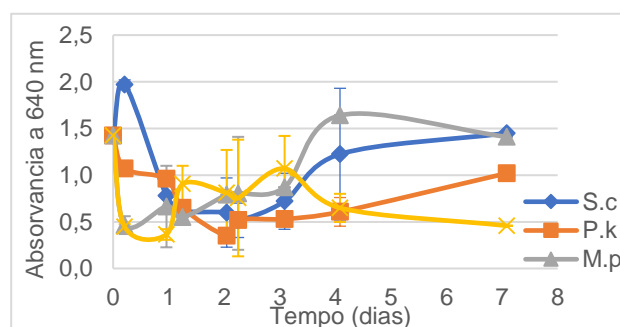


Figura 20 - Evolução da turvação durante a fermentação em mosto *Weissbier*. Ensaios inoculados com *S. cerevisiae* Blanche (S.c); *P. kluyveri* (P.k); *M. pulcherrima* (M.p); *S. ludwigii* (S.l).

Neste último ensaio, verificou-se uma diminuição gradual dos valores até às 48 horas, altura em que este atingiu o valor turvação mais baixo registado ao longo da fermentação (0,35), e que coincidiu com uma diminuição acentuada da viabilidade relativa, assim como do número de células viáveis das leveduras.

No momento da co-inoculação, os diferentes ensaios apresentaram valores de turvação relativamente próximos para três das estirpes, 0,60 (*S. cerevisiae*), 0,79 (*M. pulcherrima*) e 0,81 (*S. ludwigii*), e concordantes com o número de células totais de cada cultura ($6,3 \times 10^5$ cel/mL para *S. cerevisiae*, $1,9 \times 10^7$ cel/mL para *M. pulcherrima* e $1,98 \times 10^7$ cel/mL para *S. ludwigii*). Após a co-inoculação observou-se um aumento da turvação, que deverá corresponder a um efeito simultâneo da precipitação de proteínas, do crescimento da população da estirpe co-inoculada, e do tamanho das células de cada estirpe, razão pela qual os valores de turvação não coincidem necessariamente como os valores obtidos para as células totais no final da fermentação, e que foram de $1,5 \times 10^7$ cel/mL (*S. cerevisiae*), $4,4 \times 10^5$ cel/mL (*P. kluyveri*), $4,8 \times 10^5$ cel/mL (*M. pulcherrima*) e $1,1 \times 10^6$ cel/mL (*S. ludwigii*).

Variação da concentração de proteína ao longo da fermentação

A concentração de proteínas solúveis, cuja determinação foi realizada durante a fermentação, é um parâmetro correlacionável com a variação do número de células metabolicamente ativas ao longo do processo, mas, que pode também estar relacionado com fenómenos de autólise das leveduras.

Nas primeiras 24 horas do processo de fermentação foi possível identificar, entre os ensaios realizados e face a este parâmetro, dois comportamentos diferentes, com os ensaios de *S. cerevisiae*, *M. pulcherrima* e *S. ludwigii* a registarem uma diminuição de concentração de proteína solúvel, contrariamente ao que se verificou no ensaio com *P. kluyveri*, onde ocorreu um aumento deste valor que coincidiu com o decréscimo da turvação (Figura 21). Neste último caso, verificou-se uma coincidência entre o aumento da proteína solúvel e a diminuição do número de células total, que poderá resultar de autólise das leveduras e consequentemente ter levado à libertação de proteínas para o meio.

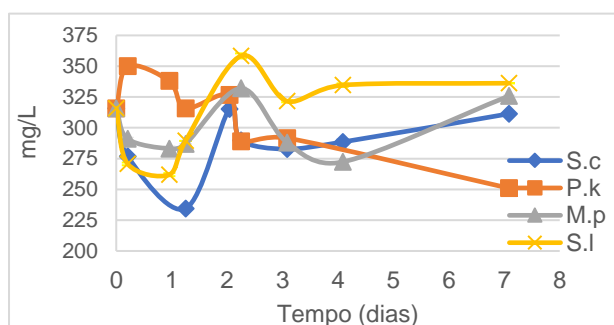


Figura 21 - Evolução da concentração de proteína solúvel nos diferentes ensaios durante a fermentação em mosto Weissbier. Ensaio inoculado com *S. cerevisiae* Blanche (S.c); *P. kluyveri* (P.k); *M. pulcherrima* (M.p); *S. ludwigii* (S.l).

Nos diferentes ensaios conduzidos em mosto *Weissbier*, com exceção do ensaio com *P. kluyveri*, não existe relação entre a variação do número de células viáveis a variação da proteína total solúvel.

Após a introdução do co-inóculo, ao segundo dia de fermentação, é de notar que os valores de concentração de proteína solúvel são bastante semelhantes, com o ensaio com *S. ludwigii* a apresentar o valor de concentração mais alto (358,38 mg/mL), e os ensaios conduzidos com a estirpe *S. cerevisiae*, *P. kluyveri* e *M. pulcherrima* a apresentarem 315,25 mg/L, 326,69 mg/L e 331,97 mg/L, respetivamente.

Com a continuação do processo os valores tendem a estabilizar, terminando os ensaios com *S. cerevisiae*, *M. pulcherrima* e *S. ludwigii* com valores mais próximos. Comparativamente, verifica-se semelhanças entre o comportamento do ensaio com *S. cerevisiae* *Blanche* e *M. pulcherrima*, muito provavelmente como resultado de uma maior dominância da estirpe comercial (co-inoculada) em relação à estirpe não convencional.

Tal como já foi previamente descrito nos ensaios de mosto *Dunkel*, poderão ocorrer alterações do conteúdo proteico do mosto (proveniente do malte) durante a fermentação, em resultado da atividade enzimática extracelular. Para além disso, uma prolongada exposição a valores de pH baixos pode ser induzir a precipitação de uma pequena quantidade de complexos de proteínas e polifenóis, como resultado da ação enzimática das leveduras.

3.4.2. Análise dos parâmetros físicos e químicos

A fermentação do mosto é uma das principais etapas que integram o processo produtivo de cerveja, e resulta da capacidade metabólica das leveduras em consumirem os açúcares disponíveis no meio e sintetizarem etanol, glicerol, entre outros metabolitos secundários. De forma a garantir a eficiência dos processos metabólicos ao longo da fermentação, é importante controlar as condições em que o processo ocorre.

Variação do valor de pH ao longo da fermentação

Um dos parâmetros que permite avaliar a evolução do processo de fermentação é o pH, resultando da relação entre aminoácidos e péptidos presentes no meio (moléculas que possuem carga iónica) e da produção de metabolitos secundários (Coote e Kirsop, 1976; O'Rourke, 2002).

Os resultados obtidos para os diferentes ensaios do mosto *Weissbier* vão ao encontro de esperado, como discriminado para os ensaios do mosto *Dunkel*, apresentando uma diminuição dos valores de pH ao longo da fermentação (Lodolo *et al.*, 2008).

Nas primeiras 5 horas de fermentação, não se verificou alterações nos valores de pH dos diferentes ensaios, muito provavelmente porque nesse espaço de tempo o efeito da ação microbiana das leveduras não foi o suficiente para ultrapassar o efeito tampão do mosto (Figura 22). No entanto, ao fim do primeiro dia do processo todos os ensaios apresentaram uma

diminuição dos valores de pH, sendo notória a diferença de comportamento entre as estirpes não-convencionais e estirpe comercial, que se destacou por uma diminuição acentuada face aos restantes.

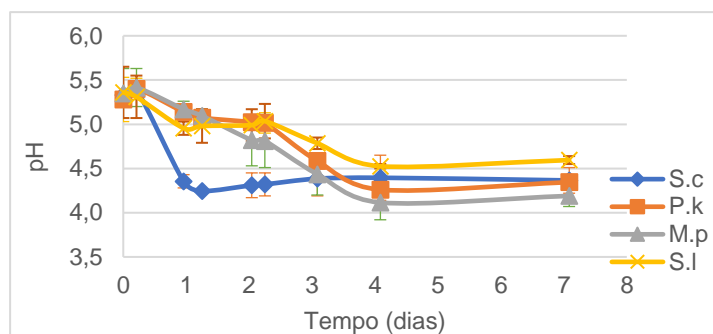


Figura 22 – Evolução do pH dos diferentes ensaios durante a fermentação em mosto *Weissbier*. Ensaios inoculados com *S. cerevisiae Blanche* (S.c); *P. kluyveri* (P.k); *M. pulcherrima* (M.p); *S. ludwigii* (S.l).

A introdução do co-inóculo conduziu à diminuição do valor de pH dos diferentes ensaios, estabilizando no período final da fermentação, com o ensaio com *S. ludwigii* a apresentar o valor final mais elevado (4,6), seguindo-se o ensaio com *P. kluyveri* (4,3) e *S. cerevisiae Blanche* (4,4), e por último o ensaio com *M. pulcherrima* (4,2). Este comportamento assemelha-se ao observado em *S. cerevisiae* durante as primeiras 24 horas, que baixa e depois estabiliza no período final da fermentação.

Açúcares Redutores

Ao longo da fermentação foi realizado o Teste Keto-Diabur-5000, com o objetivo de estimar a quantidade de glucose presente nas amostras e a sua variação durante o processo. Os resultados obtidos foram negativos para os diferentes ensaios (Figura 23), o que significa que, ou os valores de concentração de glucose nas amostras são inferiores a 0,1% (m/v), que corresponde ao limite mínimo da amplitude de leitura deste método ou, à semelhança do que aconteceu com os ensaios em mosto *Dunkel*, o método não poderá ser aplicado devido a interferências do mosto.

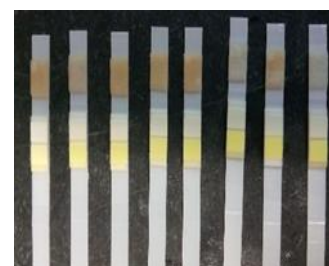


Figura 23 - Exemplo de um resultado do Teste Keto-Diabur-5000, realizado nos diferentes tempos de fermentação em mosto *Weissbier*.

Variação do valor de °Brix ao longo da fermentação

Este parâmetro permite medir os sólidos totais solúveis no mosto, e consequentemente avaliar o comportamento das leveduras, assim como a eficácia destas, face ao consumo de açúcares no decorrer do processo de fermentação. A evolução dos valores de °Brix demonstrou, de forma muito perceptível, a grande diferença que existe entre a estirpe *S. cerevisiae Blanche* e as estirpes não convencionais (Figura 24) e coincidiu com o comportamento observado para a variação do pH.

Os resultados obtidos estão de acordo com o esperado, e com o que foi previamente descrito para os ensaios do mosto *Dunkel*, verificando-se uma diminuição considerável dos valores de °Brix entre o início e o fim do processo de fermentação.

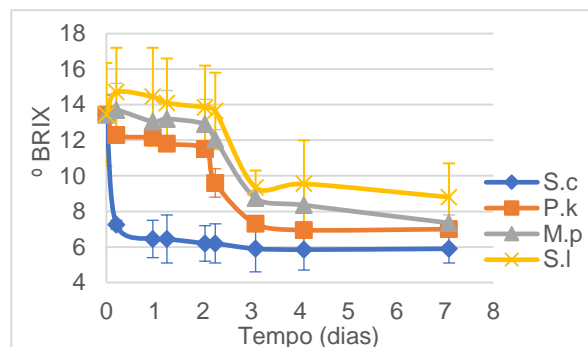


Figura 24 - Evolução do ° Brix nos diferentes ensaios durante a fermentação em mosto *Weissbier*. Ensaios inoculados com *S. cerevisiae Blanche* (S.c); *P. kluyveri* (P.k); *M. pulcherrima* (M.p); *S. ludwigii* (S.l).

Com o arranque da fermentação verificou-se uma diminuição acentuada dos valores de °Brix no ensaio com *S. cerevisiae Blanche*, apresentando um valor muito baixo logo ao fim de cinco horas de processo (7,25° Brix), em comparação com os restantes ensaios realizados com estirpes não comerciais, cujos valores são substancialmente mais altos. No entanto, dentro deste grupo de estirpes destacou-se ainda o ensaio realizado com *S. ludwigii* por apresentar o valor de °Brix mais elevado (13,85° Brix) no momento da co-inoculação.

Ao fim do segundo dia de fermentação, e por influencia da introdução da estirpe comercial, verificou-se uma diminuição acentuada dos valores para todos os ensaios das estirpes não convencionais, aproximando-se dos valores do ensaio com *S. cerevisiae Blanche* ($\approx 6^\circ$ Brix).

A relação entre os valores de °Brix encontram-se até ao final da fermentação, com *S. ludwigii* apresentando o valor de °Brix mais elevado (8,80° Brix), seguido do ensaio com *M. pulcherrima* (7,35° Brix), *P. kluyveri* (7,00° Brix) e *S. cerevisiae Blanche* (5,90° Brix).

Tomando apenas por base os resultados obtidos nesta análise seria possível inferir que, não se verificou o consumo total dos açúcares em todos os ensaios. A avaliação posteriormente realizada aos açúcares disponíveis no mosto indica que no final da fermentação apenas existe maltotriose, pelo que os valores de °Brix deverão resultar deste e de outros compostos solúveis presentes no mosto.

Variação da densidade ao longo da fermentação

Este parâmetro apresenta a particularidade de relacionar a evolução do número de células dos ensaios e a eficiência da sua ação microbiana, durante o processo de fermentação. A densidade dos ensaios depende assim do tipo e quantidade de compostos em solução/suspensão.

Os resultados obtidos nos diferentes ensaios vão ao encontro do esperado, isto porque, de uma forma geral, ao longo de todo o processo de fermentação, os valores da densidade tendem a diminuir, em resultado da atividade fermentativa das leveduras e consequente libertação de dióxido de carbono.

À semelhança do que se verificou nos ensaios conduzidos em mosto *Dunkel*, os valores de densidade para os diferentes ensaios no final da fermentação são bastante semelhantes entre si, demonstrando que existe um balanço entre o crescimento microbiano, a densidade celular e a quantidade de compostos em solução.

Com o arranque da fermentação, o ensaio com *S. cerevisiae Blanche* destacou-se por apresentar uma descida mais acentuada dos valores, estabilizando ao fim do primeiro dia do processo. No caso dos ensaios conduzidos em estirpes não-convencionais existe um padrão de comportamento idêntico a todos, os valores diminuem de forma identifica até ao fim do primeiro dia de fermentação, momento a partir do qual o ensaio com *P. kluyveri* se destacou por apresentar uma descida acentuada dos valores de densidade (Figura 25).

Com a introdução do co-inóculo, ao segundo dia de fermentação, o ensaio conduzido com a estirpe *S. cerevisiae Blanche* não sofreu alterações notórias até ao final do processo, terminando com uma densidade de 0,98 mg/mL. Nos ensaios conduzidos com as estirpes não-convencionais, verificou-se uma diminuição gradual dos valores de densidade a partir do segundo dia do processo. No período final os valores dos ensaios tenderam a estabilizar, terminando a fermentação com 0,97 mg/mL, 0,96 mg/mL e 0,98 mg/mL, no ensaio com *P. kluyveri*, *M. pulcherrima* e *S. ludwigii*, respetivamente.

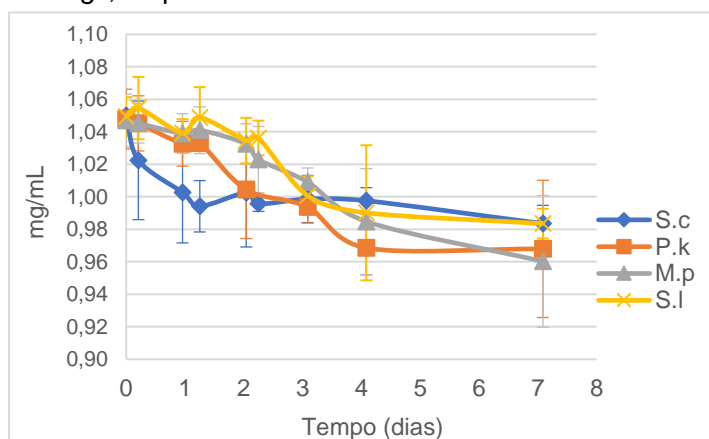


Figura 25 – Evolução da densidade nos diferentes ensaios durante a fermentação em mosto *Weissbier*. Ensaios inoculados com *S. cerevisiae Blanche* (S.c); *P. kluyveri* (P.k); *M. pulcherrima* (M.p); *S. ludwigii* (S.l).

Análise dos ensaios por HPLC

A análise da variação da concentração dos diferentes constituintes dos ensaios permite avaliar o desempenho da ação microbiana no que respeita o consumo de açúcares e a produção de etanol e glicerol ao longo do processo fermentativo. Nos diferentes ensaios foi notório o consumo dos açúcares de forma sequencial, numa primeira fase ocorre o consumo de glucose, seguido de maltose e por último verifica-se o consumo incompleto de maltotriose, o que vem ao encontro dos dados descritos na literatura (Walker e Stewart, 2016).

No que respeita o consumo de açúcares, o ensaio realizado com *S. cerevisiae* *Blanche* destacou-se dos restantes pelo facto de a concentração de glucose atingir o esgotamento ao fim do primeiro dia de fermentação (Figura 26). Com a diminuição da concentração deste açúcar, verificou-se um aumento do consumo de maltose, aumento da produção de etanol e glicerol e posteriormente consumo (baixo) de maltotriose.

No ensaio conduzido com *P. kluyveri*, a glucose atingiu o esgotamento ao fim de dois dias de fermentação, momento a partir do qual se verificou um aumento do consumo de maltose, que por sua vez, é consumida totalmente ao fim dos sete dias do processo (Figura 26B). No caso dos ensaios de *M. pulcherrima* e *S. ludwigii*, a glucose atingiu o esgotamento ao fim de 72 e 31,2 horas, respetivamente. Nestes três ensaios, o início do consumo de maltose coincidiu com a introdução da co-cultura de *S. cerevisiae* coincidindo com a menor capacidade de metabolização de melibiose descrita para estas estirpes (Dietvorst *et al.*, 2005).

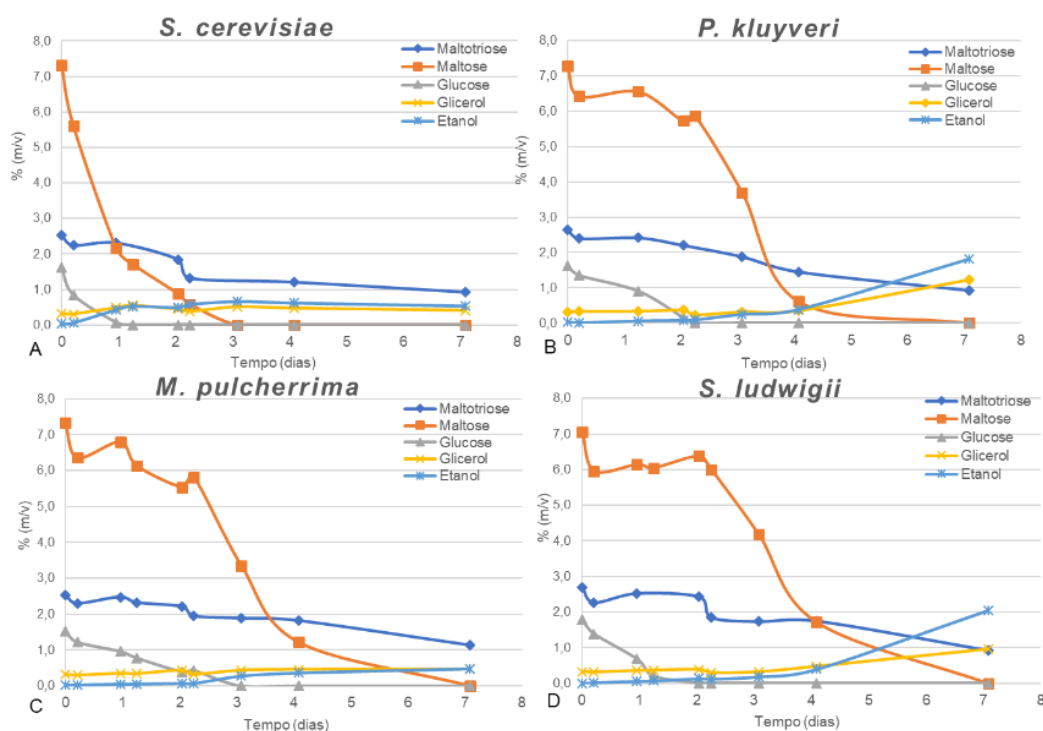


Figura 26 - Consumo de açúcares e de produção de etanol, e glicerol, ao longo da fermentação nos diferentes ensaios em mosto *Weissbier*. Ensaios inoculados com *S. cerevisiae* *Blanche* (A); *P. kluyveri* (B); *M. pulcherrima* (C); *S. ludwigii* (D).

No que respeita à maltotriose, os diferentes ensaios apresentaram valores finais 0,92% (m/v) (*P. kluyveri*), 1,14% (m/v) (*M. pulcherrima*) e 0,92% (m/v) (*S. ludwigii*), ou seja, existe ainda um valor residual deste açúcar que nunca chega a ser completamente consumido. Os resultados obtidos nesta análise estão de acordo com o expectável, uma vez que, correspondem ao comportamento característico das leveduras *Ale* (Dietvorst *et al.*, 2005).

Durante a fermentação, e simultaneamente com o consumo dos açúcares, as três estirpes não convencionais comportaram-se de igual forma até ao momento da inoculação em relação à produção de etanol e glicerol. Em todos os ensaios, a concentração destes compostos manteve-

se constante até ao momento em que se inoculou *S. cerevisiae*, momento a partir do qual a concentração de etanol aumentou progressivamente tal como esperado (Stewart, 2006). Nos ensaios com *P. kluyveri* e *S. ludwigii* observou-se um aumento mais acentuado do etanol ao fim do quarto dia (segundo dia após a co-inoculação) o que coincidiu com um aumento acentuado do número de células (Figura 17A), terminando com valores de etanol superiores em relação às outras duas estirpes (1,81% (m/v) (*P. kluyveri*), 2,04% (m/v) (*S. ludwigii*), 0,48% (m/v) (*M. pulcherrima*) e 0,53% (m/v) (*S. cerevisiae* Blanche). No que diz respeito ao glicerol, é de referir a existência de glicerol desde o início em todos os ensaios, que corresponde a um valor de 0,32% (m/v), e que apenas aumenta de forma mais relevante na fermentação com *P. kluyveri* e *S. ludwigii*.

3.5. Ensaios de fermentação com mosto tipo *Stout*

O estilo *Stout* utiliza como matéria prima leveduras de "alta fermentação", nomeadamente a *Saccharomyces cerevisiae* Safale S-04, conjugado com maltes torrados, como caramelo, chocolate e cristal, que conferem à cerveja uma cor preta. As cervejas *Stouts* são equilibradas, apresentam um aroma doce e tostado, com notas a café, chocolate e caramelo (Strong e England, 2015).

3.5.1. Análise Microbiológica

À semelhança dos restantes mostos, previamente descritos, nos ensaios conduzidos em mosto *Stout* determinou-se a variação da viabilidade total das células das diferentes estirpes e da sua capacidade de multiplicação, no sentido de avaliar o estado fisiológico ao longo do processo fermentativo.

Os diferentes ensaios desenvolvidos no mosto de estilo *Stout*, apresentam semelhanças de comportamento ao longo do processo fermentativo, no que respeita a variação do número de células viáveis e a sua viabilidade relativa.

Os padrões de crescimento observados foram semelhantes ao longo do processo fermentativo, no entanto, o ensaio com *Pichia kluyveri* destacou-se como o ensaio com maior densidade populacional no momento da co-inoculação com *S. cerevisiae* Safale S-04 ($9,58 \times 10^8$ cel.mL⁻¹) (Figura 27A). Para qualquer dos ensaios, este valor não poderá ser atribuído à adição do inóculo de *S. cerevisiae* S-04 à fermentação, uma vez que, tal como nos outros casos, este representa apenas cerca de aproximadamente 1% do total de células.

Após a introdução do co-inóculo, ocorreu uma diminuição da densidade populacional no ensaio inoculado com *S. cerevisiae* S-04 e *P. kluyveri*, em oposição aos ensaios de *M. pulcherrima* e *S. ludwigii*. Esta variação da densidade populacional é resultado da relação entre a diminuição populacional da estirpe inicial, que se encontra em fase de declínio, e o aumento da população do co-inóculo. No final da fermentação, a concentração de células final foi praticamente idêntica em todos os ensaios e da ordem de grandeza de 1×10^8 cel.mL⁻¹.

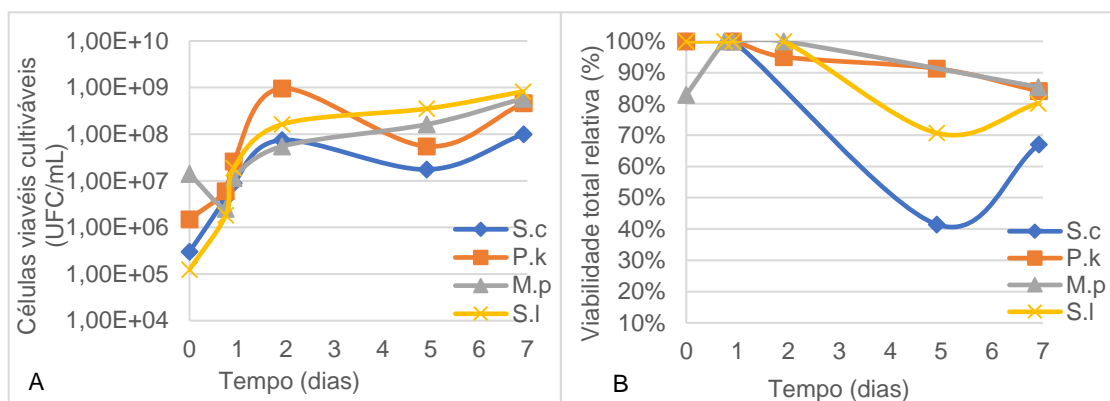


Figura 27- Viabilidade das estirpes durante a fermentação em mosto *Stout*. A) Curvas de crescimento das leveduras, representando a evolução das células viáveis cultiváveis ao longo do processo de fermentação. B) Variação da viabilidade relativa nos ensaios fermentativos. Ensaio inicialmente inoculado com *S. cerevisiae* S-04 (S.c); *P. kluyveri* (P.k); *M. pulcherrima* (M.p); *S. ludwigii* (S.l).

Comparando a viabilidade relativa das estirpes de leveduras não convencionais, antes e depois da co-inoculação (Figura 27B), e, à semelhança do que se sucedeu na capacidade multiplicativa, existe influência da interação entre a estirpe comercial utilizada para a co-inoculação e as restantes estirpes. Isto porque, tal como esperado, a partir do momento da co-inoculação ocorreu uma diminuição da viabilidade relativa em todas as estirpes não convencionais. No caso do ensaio realizado exclusivamente com a estirpe comercial de *S. cerevisiae* S-04, não se esperaria, no entanto, uma diminuição tão acentuada da viabilidade relativa da população uma vez que seria expectável que ao fim de cinco dias a população inicial ainda conservasse viabilidade, estando este valor acrescido de uma fração significativa de células viáveis resultante do co-inóculo com a mesma estirpe que foi realizado ao segundo dia. Por outro lado, no caso das fermentações realizadas com as estirpes não-convencionais, o valor relativamente elevado de células com capacidade metabólica observado no final da fermentação é consistente com os resultados obtidos para as células viáveis cultiváveis (Figura 27A), podendo ser igualmente atribuído à manutenção de um bom estado fisiológico por parte das células co-inoculadas ao segundo dia.

Variação do valor da turvação ao longo da fermentação

A turvação dos ensaios ao longo da fermentação, cujos valores correspondem à densidade ótica a 640nm, está diretamente relacionado com a variação do número total de células nos diferentes ensaios, assim como com a ação enzimática. Desta forma, a turvação total é resultado do balanço entre o aumento da população de leveduras e a eficiência da ação enzimática, ao longo do processo fermentativo, que degrada compostos que poderão contribuir para esta.

Em relação à variação da turvação do mosto *Stout* ao longo da fermentação (Figura 28, Tabela 10), foi notória a diminuição que ocorreu neste parâmetro ao fim de um dia de fermentação, aumentando depois até ao final de acordo com a estirpe usada, no entanto, sem atingir os valores iniciais. Este abaixamento inicial dever-se-á maioritariamente à ação enzimática, uma vez que, o aumento da população neste período não foi suficientemente elevado para contrabalançar a redução/deposição de proteínas e β -glucanos.

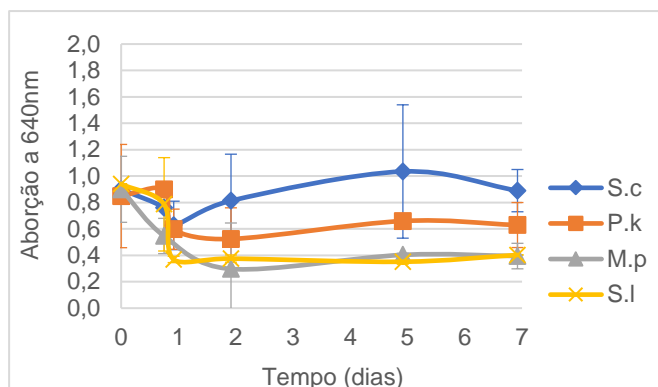


Figura 28 - Evolução da turvação dos diferentes ensaios durante a fermentação em mosto *Stout*. Ensaios inoculados com *S. cerevisiae* S-04 (S.c); *P. kluyveri* (P.k); *M. pulcherrima* (M.p); *S. ludwigii* (S.l).

Tabela 10 – Turvação observada no início e fim da fermentação em mosto *Stout*.

Estirpe	Turvação (640 nm)	
	Início	Fim
<i>S. cerevisiae</i> S-04	0,90	0,89
<i>P. kluyveri</i>	0,85	0,63
<i>M. pulcherrima</i>	0,90	0,39
<i>S. ludwigii</i>	0,94	0,40

No momento da co-inoculação, o ensaio com *S. cerevisiae* S-04 destacou-se por apresentar o valor mais alto, de 0,81, que coincidiu com um aumento considerável da população microbiana registado ao fim de dois dias (Figura 27A), o mesmo se registou no caso do ensaio com a estirpe *S. ludwigii*, embora de forma menos acentuada.

Por outro lado, quer no caso do ensaio inoculado com a estirpe *P. kluyveri*, como no ensaio com *M. pulcherrima*, observou-se uma redução da turvação durante a fermentação, apesar de ser mais acentuada neste último ensaio. Estes resultados podem ser atribuídos à variação do número total de células de cada estirpe que, tal como esperado, foi maior no caso das estirpes que apresentam maior turvação (Tabela 10).

Com a continuação do processo fermentativo, os valores de turvação tenderam a estabilizar, sendo que, os ensaios terminaram com um valor de turvação próximo do registado no segundo dia. Uma vez que, a ordem de grandeza dos valores obtidos para as células totais no final da fermentação foi semelhante entre ensaios, as diferenças nos valores finais não podem ser atribuídas às diferenças no número de células existente, podendo então dever-se a diferenças no tamanho das células de cada estirpe (Figura 10, Tabela 10).

Os resultados de turvação obtidos nos diferentes ensaios vão ao encontro do desejado, uma vez que, no caso da cerveja de tipo *Stout* pretende-se uma cerveja clara, sem turvação ou quase inexistente.

Variação da concentração de proteína ao longo da fermentação

A determinação da concentração de proteína solúvel, ao longo da fermentação, permite uma correlação com o número de células metabolicamente ativas, uma vez que, poderá estar relacionado com fenómenos de autólise das leveduras.

Com base da análise da Figura 29, assim como da Tabela 11, foi possível avaliar a evolução da concentração de proteína nos diferentes ensaios. Nas primeiras 24 horas do processo fermentativo verificaram-se dois comportamentos distintos. Face ao momento inicial da etapa

fermentativa, ocorreu uma diminuição de concentração de proteína solúvel nos ensaios inoculados com a estirpe *M. pulcherrima* e *S. ludwigii*, mantendo-se aproximadamente constante a proteína no caso das fermentações com *S. cerevisiae* S-04 e *P. kluyveri*.

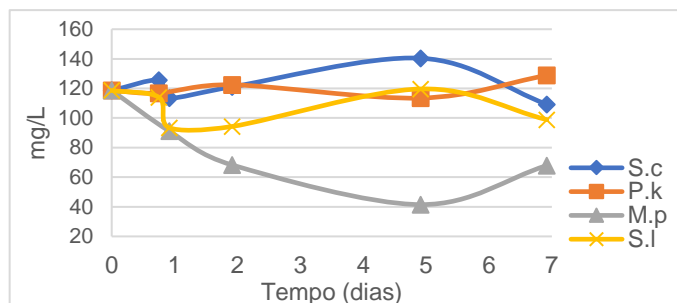


Figura 29 - Evolução da concentração de proteína solúvel nos diferentes ensaios durante a fermentação em mosto *Stout*. Ensaios inoculados com *S. cerevisiae* S-04 (S.c); *P. kluyveri* (P.k); *M. pulcherrima* (M.p); *S. ludwigii* (S.l).

Tabela 11 –Concentração de proteína no início e fim da fermentação em mosto *Stout*.

Estirpe \ Tempo	Concentração (mg/L)	
	Início	Fim
<i>S. cerevisiae</i> S-04	118,59	109,26
<i>P. kluyveri</i>	118,59	128,80
<i>M. pulcherrima</i>	118,59	67,89
<i>S. ludwigii</i>	118,59	98,87

Após este período, a concentração de proteínas em solução manteve-se aproximadamente constante exceto no caso do ensaio com *M. pulcherrima* que diminuiu até 41,48 mg/L (4,92 dias). No momento da co-inoculação, o ensaio com *S. cerevisiae* S-04 que apresentou uma concentração de 120,06 mg/L de proteína em solução, e o ensaio com *M. pulcherrima*, apresentou a menor concentração de proteína (94,30 mg/L) e que, tal como referido, se manteve até ao início do quinto dia de fermentação. Até ao final da fermentação verificaram-se três comportamentos distintos, duas das estirpes (*P. kluyveri* e *S. ludwigii*) mantiveram os níveis constantes, no ensaio de *M. pulcherrima* observou-se uma subida, e uma descida no ensaio *S. cerevisiae* S-04, apesar de os valores neste último serem elevados.

Tal como se verificou nos diferentes ensaios de mosto *Weissbier*, para os ensaios conduzidos em mosto *Stout* não foi possível correlacionar-se os valores da proteína solúvel com os valores de viabilidade celular, isto porque, não existiu relação entre a variação do número de células viáveis com o aumento, ou diminuição, da proteína total solúvel.

De acordo com o descrito para os ensaios de *Dunkel*, o conteúdo de proteínas que existe no mosto, proveniente do malte, pode sofrer alterações durante a fermentação, como resultado da atividade de proteases extracelular, tal como, de uma prolongada exposição a valores de pH baixos, pode conduzir à precipitação de uma pequena quantidade de complexos de proteínas e polifenóis como resultado da ação enzimática das leveduras, à semelhança do que se observou no caso do ensaio inoculado com a estirpe *S. cerevisiae* S-04. Tal não justifica, contudo, as variações observadas no caso do ensaio com a estirpe *M. pulcherrima*.

3.5.2. Análise dos parâmetros físicos e químicos

A fermentação é uma consequência do processo metabólico das leveduras, que através do consumo dos açúcares disponíveis no meio, provenientes do malte, e síntese de etanol, glicerol, entre outros metabolitos, constitui uma das principais etapas do fabrico de cerveja. Para que a ação metabólica das leveduras ocorra de forma eficiente é fundamental o controlo das condições de fermentação.

Variação do valor de pH ao longo da fermentação

O pH do mosto, durante a fermentação, é influenciado não só pelo metabolismo das leveduras, como também, pela presença de aminoácidos e os péptidos, sendo considerado um dos principais parâmetros de controlo de qualidade do produto final.

Os resultados obtidos para os diferentes ensaios do mosto *Stout* vão ao encontro do esperado, como discriminado para os ensaios do mosto *Dunkel*.

Com base na variação do valor de pH nos diferentes ensaios realizados, e tal como demonstra a Figura 30, com o arranque da fermentação ocorreu a diminuição do valor de pH, apesar da influência das diferentes estirpes só ser notória após as 18 horas de fermentação, sendo mais acentuada no caso do mosto fermentado por *S. cerevisiae* S-04. A semelhança relativa dos valores de pH nas primeiras horas de fermentação, e diferenças após este período, para as quatro estirpes inoculadas poderá ser atribuída a distintos tipos de metabolismo realizado no início (respiração e respiração/fermentação) e algumas horas após a inoculação (maioritariamente fermentativo uma vez que a população é maior e o oxigénio já foi consumido), havendo no segundo caso maior produção de compostos que poderão reduzir o valor de pH do mosto

No momento da co-inoculação o ensaio com *S. cerevisiae* S-04 apresentou o valor mais baixo (3,98), em oposição aos ensaios inoculados com *P. kluyveri* e *S. ludwigii* (4,17 e 4,19, respetivamente). No período entre a co-inoculação e o último dia de fermentação, verificou-se que, de uma forma geral, todos os ensaios sofrem um ligeiro aumento do pH, mais evidente no ensaio realizado de *S. cerevisiae* S-04 que, por sua vez, termina o período fermentativo com um valor de pH de 4,49 (Tabela 12).

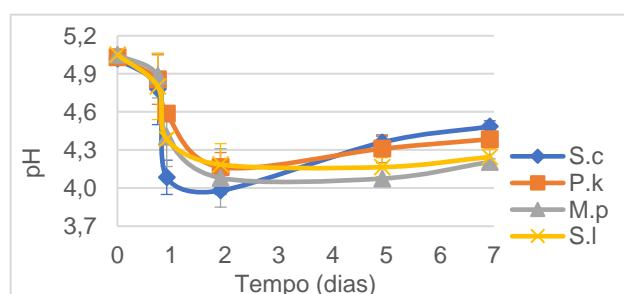


Figura 30 - Evolução do pH dos diferentes ensaios durante a fermentação em mosto *Stout*. Ensaios inoculados com *S. cerevisiae* S0-4 (S.c); *P. kluyveri* (P.k); *M. pulcherrima* (M.p); *S. ludwigii* (S.l).

Tabela 12 – Relação entre os valores de pH, no início e fim da fermentação em mosto *Stout*.

Estirpe	pH	
	Início	Fim
<i>S. cerevisiae</i> S-04	5,02	4,49
<i>P. kluyveri</i>	5,03	4,39
<i>M. pulcherrima</i>	5,05	4,21
<i>S. ludwigii</i>	5,05	4,25

Açúcares Redutores

No sentido de estimar a quantidade de glucose presente nos diferentes ensaios, de uma forma rápida, recorreu-se ao Teste Keto-Diabur-5000. À semelhança das análises realizadas nos ensaios em mosto *Dunkel* e *Weissbier* os resultados obtidos colocam em causa a fiabilidade desta análise, uma vez que, ao longo da fermentação, e em particular no momento inicial do processo, a concentração de glucose presente nos diferentes ensaios foi sempre inferior a 0,1% (m/v) (Figura 31).

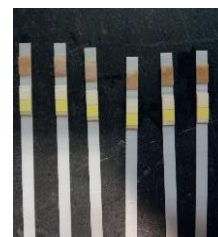


Figura 31 - Resultado do Teste Keto-Diabur- 5000, nos diferentes tempos de fermentação no ensaio com *S. cerevisiae* S-04 em mosto *Stout*.

Variação do valor de °Brix ao longo da fermentação

O °Brix é um parâmetro permite avaliar o consumo de açúcares, e consequentemente, a eficiência da ação enzimática ao longo da fermentação.

Com o decorrer da fermentação verificou-se, em todos os ensaios, uma diminuição dos valores de °Brix entre o início e o fim da fermentação, o que vai de encontro ao esperado.

À semelhança dos ensaios conduzidos com mosto *Dunkel*, com base na análise dos valores de °Brix é possível afirmar que, no decorrer da fermentação ocorre um consumo incompleto dos açúcares. Estes valores não estão coerentes com os resultados obtidos na determinação dos açúcares redutores, apresentados anteriormente, o que indica que os valores de °Brix obtidos resultam de outros compostos solúveis presentes no mosto.

Nas primeiras 24 horas do processo de fermentação, os diferentes ensaios apresentaram um comportamento idêntico, evidenciando que a influência das diferentes estirpes neste parâmetro só foi notória com a continuação do processo, quando a população atingiu valores que metabolizam significativamente os açúcares presentes de modo a permitir ver variações.

Ao segundo dia, e com a introdução da estirpe comercial, o ensaio inoculado com a estirpe *S. cerevisiae* S-04 sofreu uma oscilação acabando por estabilizar e termina o período fermentativo com 6,85° Brix (Figura 32, Tabela 13).

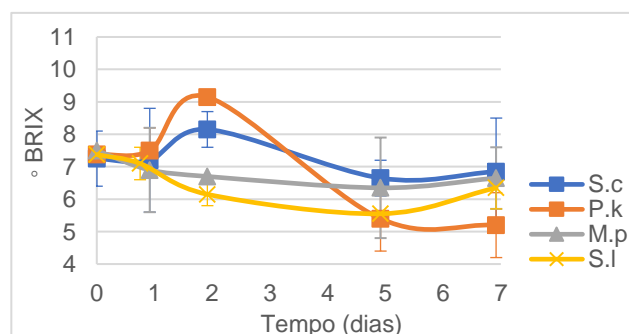


Figura 32 - Evolução do °Brix nos diferentes ensaios durante a fermentação em mosto *Stout*. Ensaios inoculados com *S. cerevisiae* S0-4 (S.c); *P. kluyveri* (P.k); *M. pulcherrima* (M.p); *S. ludwigii* (S.l).

Tabela 13 – ° Brix no início e fim da fermentação em mosto *Stout*.

Tempo Estirpe	°Brix	
	Início	Fim
<i>S. cerevisiae</i> S-04	7,25	6,85
<i>P. kluyveri</i>	7,38	5,20
<i>M. pulcherrima</i>	7,50	7,40
<i>S. ludwigii</i>	7,38	6,35

O ensaio com a estirpe *P. kluyveri* apresentou uma oscilação até ao quinto dia fermentativo, estabilizando no período final. No que respeita os ensaios conduzidos com as estirpes *M. pulcherrima* e *S. ludwigii*, verificou-se uma diminuição do °Brix ao longo do processo fermentativo, sendo que nas últimas 24 horas do processo os valores sofreram uma ligeira subida. O ensaio inoculado com a estirpe *M. pulcherrima* correspondeu ao ensaio com maior valor de °Brix no final da fermentação.

Variação da densidade ao longo da fermentação

A densidade do mosto, durante o processo fermentativo, depende da variação do número de células, do consumo de açúcares, da produção de etanol e dióxido de carbono, ou seja, este parâmetro está diretamente relacionado com o tipo e quantidade de compostos em solução/suspensão. A evolução deste parâmetro, nos diferentes ensaios, não apresentou alterações significativas entre o início e o fim da fermentação (Figura 33).

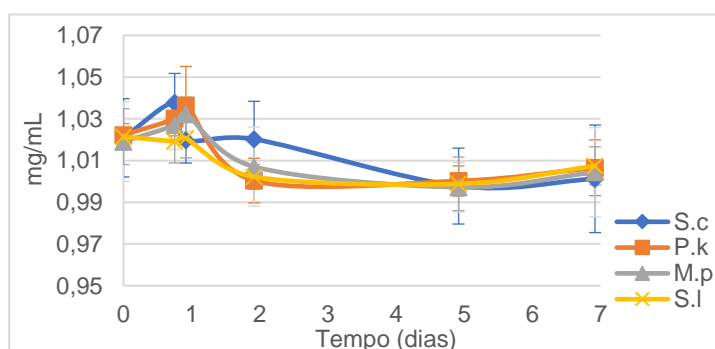


Figura 33 – Evolução da densidade nos diferentes ensaios durante a fermentação em mosto *Stout*. Ensaios inoculados com *S. cerevisiae* S-04 (S.c); *P. kluyveri* (P.k); *M. pulcherrima* (M.p); *S. ludwigii* (S.l).

Diferentes ensaios apresentaram um momento inicial onde se verificou uma ligeira subida da densidade, seguindo-se uma redução da densidade que se manteve até ao final da fermentação. Os valores finais da densidade encontram-se abaixo dos valores iniciais, o que vai ao encontro do esperado (Brigss *et al.*, 2004). Isto porque, a densidade está inversamente relacionada com a atividade fermentativa. e, o facto de as fermentações se darem em sistema aberto, permite a libertação do dióxido de carbono e consequente diminuição da densidade mais acentuada para *S. cerevisiae*, a levedura fermentativa por excelência, e para *M. pulcherrima*. Para além disso, a densidade está também relacionada com o crescimento microbiano (Figura 27) e a densidade das células. Uma vez que, o número total de células no final da fermentação foi semelhante, coloca-se a hipótese de que um maior volume celular possa ter como resultado uma menor densidade das partículas (células) e consequentemente uma menor densidade da suspensão.

Análise dos ensaios por HPLC

Nos diferentes ensaios conduzidos em mosto *Stout*, e ao contrário do esperado, no momento inicial do processo a glucose era o açúcar que se encontrava em maior concentração nos diversos ensaios (4,17% m/v), seguido da maltose (1,74% m/v) e da maltotriose (1,67% m/v) (Figura 34).

Esta maior concentração de glucose face à maltose, poderá ter resultado de um processo de hidrólise/fermentação parcial durante a fase de descongelação do mosto que, ao contrário dos outros mostos foi descongelado à temperatura ambiente por um período mais longo. Os valores obtidos para a concentração destes dois açúcares vêm ao encontro desta hipótese, não só pela alteração na relação das concentrações já referida, como também pelo facto de a concentração de maltose ser inferior à esperada (Budroni *et al.*, 2017).

Atendendo aos resultados obtidos para o consumo dos açúcares, a glucose foi o primeiro açúcar a atingir o esgotamento, facto comum aos diferentes ensaios, sendo que, no caso do ensaio com *S. ludwigii* a glucose apresentavam valores residuais ao fim das primeiras 24 horas de fermentação (0,11% (m/v)) (Figura 34D), enquanto que, nos ensaios inoculados com *S. cerevisiae* S-04, *P. kluyveri* e *M. pulcherrima* (Figura 34A, Figura 34B e Figura 34C, respetivamente) o consumo total deste açúcar foi menos acentuado, sendo que, o seu esgotamento só ocorreu ao fim do quarto dia fermentativo. No entanto, quando se estimou o valor para a taxa específica de consumo neste ensaio verificou-se que o ensaio inoculado com *P. kluyveri* apresentou a maior taxa de consumo de glucose ($184,1 \text{ g.dia}^{-1}.\text{g}^{-1}$) comparativamente aos ensaios com *S. cerevisiae* S-04 ($24,4 \text{ g.dia}^{-1}.\text{g}^{-1}$), *M. pulcherrima* ($43,6 \text{ g.dia}^{-1}.\text{g}^{-1}$) e *S. ludwigii* ($13,4 \text{ g.dia}^{-1}.\text{g}^{-1}$). Nos diferentes ensaios, ao contrario do esperado e descrito nos ensaios conduzidos em mosto *Weissbier*, não é claro que o consumo de açúcares ocorra de uma forma sequencial. Numa fase inicial ocorreu o esgotamento da glucose, verificando-se maior consumo de maltose e maltotriose na fase final do processo, no entanto, não ocorreu o consumo total deste último açúcar, que corresponde ao comportamento característico das estirpes *Ale* durante o processo de fermentação (Dietvorst *et al.*, 2005).

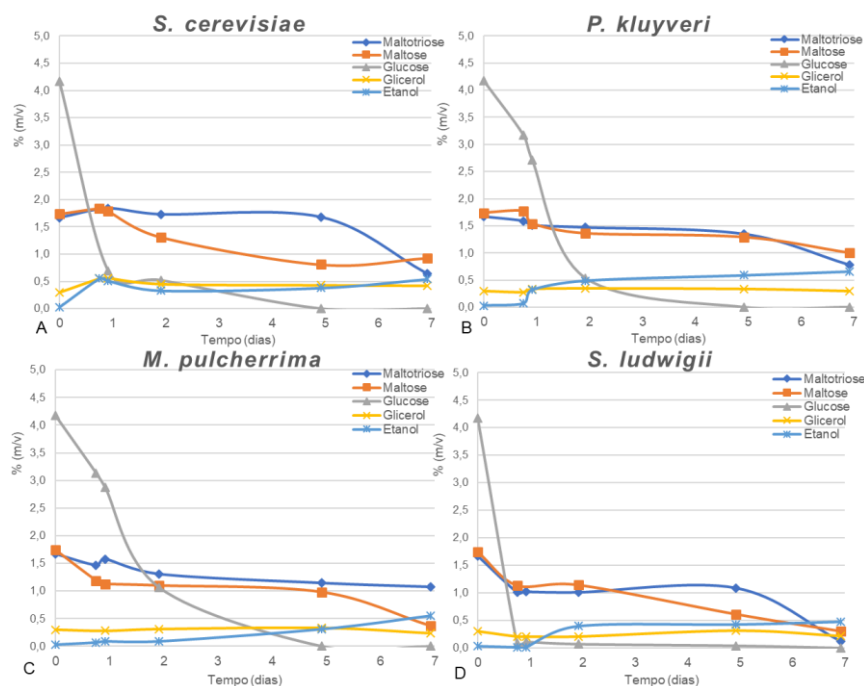


Figura 34 - Consumo de açúcares e de produção de etanol, e glicerol, ao longo da fermentação nos diferentes ensaios em mosto *Stout*. Ensaios inoculados com *S. cerevisiae* S-04 (A); *P. kluyveri* (B); *M. pulcherrima* (C); *S. ludwigii* (D).

No que respeita a síntese de glicerol, logo no momento inicial da fermentação, os quatro ensaios apresentavam 0,30% (m/v) deste composto na sua composição. Este valor, não poderá ter resultado de uma fermentação inicial durante o processo de descongelamento uma vez que o valor de etanol é próximo de zero. Ao longo do processo fermentativo, a concentração de glicerol tendeu a variar de ensaio para ensaio, verificando-se que, no final da fermentação o ensaio inoculado com *P. kluyveri* apresentava a mesma concentração que no início do processo, enquanto que nos ensaios de *M. pulcherrima* e *S. ludwigii* apresentaram valores inferiores ao arranque (0,24% (m/v) e 0,22% (m/v), respetivamente). O ensaio com *S. cerevisiae* S-04 foi o único em que se verificou um aumento da concentração entre o início e o fim da fermentação, terminando o processo com 0,42% (m/v) de glicerol na sua composição.

Ao analisar a evolução da concentração de etanol na primeira etapa de fermentação, foi possível verificar que, no ensaio inoculados com *S. cerevisiae* S-04, a concentração de etanol aumentou logo nas primeiras 24 horas do processo, que coincidiu com a altura em que uma grande parte da glucose está a ser consumida. Nos ensaios com *P. kluyveri* e *S. ludwigii* a concentração de etanol aumentou com a entrada no segundo dia do processo, no entanto, no ensaio inoculados com *M. pulcherrima* esse aumento apenas se verificou com a entrada no terceiro dia de fermentação. Com a continuação do processo, concentração deste composto, nos ensaios com *S. cerevisiae* S-04, *P. kluyveri* e *S. ludwigii* não ocorrem alterações acentuadas, enquanto que, no ensaio inoculado com *M. pulcherrima* a concentração de etanol tendeu a aumentar, o que corresponde a uma taxa de produção de etanol superior em *M. pulcherrima* ($0,20 \text{ g.dia}^{-1}.\text{g}^{-1}$), seguida de *P. kluyveri* ($0,15 \text{ g.dia}^{-1}.\text{g}^{-1}$) e de *S. ludwigii* ($0,12 \text{ g.dia}^{-1}.\text{g}^{-1}$) e *S. cerevisiae* ($0,11 \text{ g.dia}^{-1}.\text{g}^{-1}$). No final do processo os diferentes ensaios apresentaram 0,66% (m/v) (*P. kluyveri*), 0,55% (m/v) (*M. pulcherrima*), 0,54% (m/v) (*S. cerevisiae* S-04) e 0,48% (m/v) (*S. ludwigii*). De ressaltar no entanto, que tanto *M. pulcherrima* como *P. kluyveri* são consideradas leveduras essencialmente não fermentativas, pelo que, a taxa observada de produção de etanol deverá corresponder ao efeito do metabolismo fermentativo de *S. cerevisiae*, ao passo que, no caso do consumo de glucose, uma vez que, esta é maioritariamente consumida nos dois primeiros dias, os valores refletem muito mais o metabolismo da estirpe inoculada no início.

3.6. Caracterização dos produtos finais em mosto *Dunkel*, *Weissbier* e *Stout*

Os diferentes ensaios foram analisados durante a etapa da fermentação e no fim do período de maturação, etapa que corresponde ao período de definição das características físico-químicas e sensoriais do produto final. Nesta fase, a cerveja é influenciada, em parte, pela sua receita (tipo/quantidade de malte e lúpulo), assim como pela ação das leveduras, como resultado da refermentação e da autólise que estas podem sofrer. No presente estudo, foram avaliados três estilos de cerveja que apresentam características distintas.

O estilo *Dunkel*, é caracterizado pela sua cor acastanhada escura, consequência da utilização de maltes torrados na receita, com "corpo" ligeiramente definido, e naturalmente, um *flavour* com

notas a torrados e chocolate, associado a um aroma complexo (Okafor, 2009; Strong e England, 2015).

O estilo *Weissbier*, é caracterizado por apresentar normalmente uma cor âmbar, *flavour* equilibrado e suave, com notas aromáticas de banana e cravinho, e por apresentar alta carbonatação e frescura (Strong e England, 2015).

E por último, o estilo *Stout*, é caracterizado por apresentar uma cor preta, consequência da utilização de maltes muito torrados na sua receita. As cervejas do estilo *Stout* são equilibradas, apresentam uma boa formação de espuma, e estão associadas a um sabor forte e um aroma doce e tostado, com notas a café, chocolate e caramelo (Strong e England, 2015).

Os diferentes ensaios foram sujeitos a um processo de maturação durante um mês, sendo que, no caso dos estilos *Stout* e *Weissbier* este ocorreu inicialmente a 20° C e nos últimos 15 dias a 5° C, enquanto que, para o estilo *Dunkel* o processo ocorreu a 12° C durante 7 dias e a 5° C mais três semana. A maturação ocorreu em garrafas com volume de 200 e 250 mL, às quais se adicionou 7,5 g de sacarose/L para os estilos *Weissbier* e *Dunkel* antes de engarrafar as amostras, de modo a proporcionar a carbonatação da cerveja.

3.6.1. Análise Microbiológica da cerveja após o período de maturação

A etapa de maturação, e simultaneamente de refermentação, ocorre por ação das células metabolicamente ativas que existem na cerveja não-maturada. De entre destas, algumas mantêm ainda capacidade de se multiplicar (Figura 10, Figura 19, Figura 28), sendo assim expectável que possa ocorrer um aumento da densidade celular, como resultado da metabolização da sacarose introduzida nos diferentes ensaios. Com a continuação do processo, e o esgotamento deste açúcar, as células ativas tendem a diminuir e algumas delas a lisar.

Variação da turvação entre o fim da fermentação e após a maturação

Durante o período de maturação, a turvação está diretamente dependente da relação entre o número total de células e a ação enzimática, assim como da sedimentação de polipéptidos, polifenóis, leveduras residuais, entre outros compostos, sendo por tanto expectável que se verifique uma diminuição dos valores deste parâmetro ao longo deste período.

Os resultados obtidos vão ao encontro do esperado, observando-se uma diminuição da turvação nos três estilos de cerveja, sem que, no entanto, esta desaparecesse completamente uma vez que continuam a existir células (Tabela 14). De entre estes, o estilo *Weissbier*, dada a utilização de trigo que lhe característica e que aporta um maior teor em proteínas, seria aquele em que era expectável haver uma maior turvação no final da maturação e o estilo *Dunkel* e *Stout* deveriam apresentar menor turvação uma vez que se pretendem cervejas límpidas. No entanto, atendendo aos resultados, observou-se que, ao contrário do esperado, são estes dois últimos estilos que têm maior turvação. Tendo em conta os valores obtidos para o número de células viáveis cultiváveis para os vários ensaios, verificou-se que no caso das cervejas não-maturadas destes dois estilos,

o número de UFC/mL é pelo menos cerca de uma ordem de grandeza superior (aprox. 10^7 UFC/mL) ao número de células viáveis cultiváveis presente na cerveja não maturada de mosto *Weissbier* (aprox. 10^5 - 10^6 UFC/mL). Este facto poderá justificar assim a discrepância dos valores em relação ao esperado, uma vez que o número de células à partida foi maior, podendo levar a uma maior turvação. Por outro lado, havendo mais células à partida, pode haver mais lise celular e aumentar a turvação em consequência da formação de precipitados proteína/polifenóis.

Tabela 14 – Turvação no final da fermentação e no período após o período de maturação, realizados em mosto *Dunkel*, *Weissbier* e *Stout*.

<i>Dunkel</i>			<i>Weissbier</i>			<i>Stout</i>		
	Final da ferment.	Produto Final		Final da ferment.	Produto Final		Final da ferment.	Produto Final
S.c 1	0,39 ± 0,000	0,25 ± 0,054	S.c 2	1,45 ± 0,000	0,12 ± 0,046	S.c 3	0,89 ± 0,160	0,47 ± 0,030
P. k	1,03 ± 0,000	0,49 ± 0,143	P. k	1,02 ± 0,000	0,21 ± 0,108	P. k	0,63 ± 0,170	0,54 ± 0,078
M. p	0,83 ± 0,000	0,64 ± 0,000	M. p	1,41 ± 0,000	0,58 ± 0,266	M. p	0,39 ± 0,100	0,47 ± 0,020
S. l	1,10 ± 0,000	0,46 ± 0,018	S. l	0,46 ± 0,000	0,32 ± 0,027	S. l	0,40 ± 0,000	0,39 ± 0,031

Legenda: S.c 1: *S. cerevisiae* S-23; S.c 2: *S. cerevisiae* *Blanche*; S.c 3: *S. cerevisiae* S-04; P.k: *P. kluyveri*; M.p: *M. pulcherrima*; S.l: *S. ludwigii*.

Os valores obtidos para a cerveja de estilo *Dunkel* e *Weissbier*, de uma forma geral, apresentaram algumas semelhanças, o que não se verificou no caso dos valores obtidos no final da fermentação nos ensaios em mosto *Dunkel* inoculado com as estirpes não-*Saccharomyces*. Nestes ensaios, e apesar de todos terem sido realizados em co-fermentação com *S. cerevisiae* S-23, observaram-se diferenças mais evidentes entre o final da fermentação e o final da maturação. Atendendo a que a população das leveduras não-convencionais presente tende a reduzir no final da fermentação, as diferenças observadas indicam que poderá ainda assim haver um papel destas leveduras, nem que seja através dos componentes celulares que libertam e que poderão promover o crescimento da estirpe convencional nestas condições.

Variação da concentração de proteína entre o fim da fermentação e após a maturação

O conteúdo proteico dos diferentes ensaios depende, para além da composição do mosto, da variação do número de células metabolicamente ativas, da relação com fenómenos de autólise de leveduras, e consequentemente da libertação do conteúdo intracelular.

Tal como já foi referido, a concentração de proteína de cada ensaio resulta do balanço entre o aumento do número de células ativas, como consequência da introdução de sacarose nas garrafas no momento de arranque da maturação, e o aumento de fenómenos de autólise de leveduras, que surgem como consequência do longo período de armazenamento a que os ensaios foram submetidos. Poderá existir também redução da proteína solúvel em consequência da precipitação de proteínas conjugadas com os polifenóis (Lewis e Bamforth, 2006) sendo expectável que no caso da cerveja estilo *Weissbier* este fenómeno seja mais significativo.

Tabela 15 – Concentração de proteína no final da fermentação e no período após o período de maturação, realizados em mosto *Dunkel*, *Weissbier* e *Stout*.

<i>Dunkel</i>			<i>Weissbier</i>			<i>Stout</i>		
	Final da ferment.	Produto Final		Final da ferment.	Produto Final		Final da ferment.	Produto Final
S.c 1	215,65 ± 0,00	243,60 ± 3,52	S.c 2	311,37 ± 0,00	177,04 ± 0,00	S.c 3	109,26 ± 6,87	228,45 ± 17,96
P. k	246,19 ± 0,02	243,94 ± 15,49	P. k	250,99 ± 0,00	205,65 ± 0,00	P. k	67,89 ± 13,03	221,06 ± 27,11
M. p	188,09 ± 0,02	214,01 ± 15,85	M. p	325,81 ± 0,58	175,28 ± 0,00	M. p	128,00 ± 13,03	186,55 ± 7,75
S. l	245,13 ± 0,00	265,42 ± 1,76	S. l	336,20 ± 0,00	198,87 ± 0,00	S. l	98,87 ± 0,00	233,03 ± 27,82

Legenda: S.c 1: *S. cerevisiae* S-23; S.c 2: *S. cerevisiae* *Blanche*; S.c 3: *S. cerevisiae* S-04; P.k: *P. kluyveri*; M.p: *M. pulcherrima*; S.l: *S. ludwigii*.

Nos ensaios conduzidos em mosto *Dunkel* e *Stout* verificou-se que, entre o final da fermentação e o fim da maturação, a proteína solúvel aumentou nos quatro ensaios (Tabela 15). Pelos resultados obtidos verificou-se que a população de células inicial é maior e poderá aumentar nos primeiros dias de maturação (Figura 22 e Figura 28). O aumento desta população poderá levar a um aumento do número de células em lise celular, que libertam o seu conteúdo intracelular, aumentando em simultâneo a turvação e a proteínas solúvel total.

Nos ensaios em mosto *Weissbier*, verificou-se que ocorreu uma diminuição da concentração de proteínas em todos os ensaios realizados, onde *M. pulcherrima* corresponde ao ensaio com menor valor de concentração por oposição ao ensaio com *P. kluyveri*.

Esta diminuição poderá resultar da menor população de células e consequente menor lise celular já referida anteriormente, à semelhança do que acontece no caso da evolução da turvação, uma vez que caso fosse resultado da precipitação de proteínas teríamos um decréscimo da proteína solúvel conjugada com um aumento da turvação, o que não se observa.

3.6.2. Caracterização físico-química da cerveja após o período de maturação

A análise físico-química das cervejas permite avaliar a evolução dos diferentes ensaios durante o período de maturação, e caracterizar os diferentes produtos finais.

Variação do valor de pH entre o fim da fermentação e após a maturação

À semelhança do que já foi referido, o pH do mosto é influenciado pelas múltiplas dissociações e associações que ocorrem entre ácidos fracos e bases conjugadas durante o metabolismo das leveduras, e pela produção de metabolitos secundários por parte das leveduras.

Durante o período de maturação, verificou-se que para todos os ensaios, os valores de pH não apresentam diferenças relevantes entre o início e o fim da maturação (Tabela 16), o que se poderá dever a um certo poder tampão das proteínas e outros compostos libertados pelas células.

Tabela 16 – pH no final da fermentação e no período após o período de maturação, realizados em mosto *Dunkel*, *Weissbier* e *Stout*.

<i>Dunkel</i>			<i>Weissbier</i>			<i>Stout</i>		
	Final da ferment.	Produto Final		Final da ferment.	Produto Final		Final da ferment.	Produto Final
S.c 1	4,26 ± 0,03	3,980 ± 0,03	S.c 2	4,40 ± 0,15	4,305 ± 0,11	S.c 3	4,49 ± 0,04	4,285 ± 0,06
P. k	4,32 ± 0,02	4,145 ± 0,05	P. k	4,32 ± 0,04	4,135 ± 0,16	P. k	4,39 ± 0,08	4,240 ± 0,03
M. p	4,17 ± 0,00	4,005 ± 0,01	M. p	4,20 ± 0,12	4,300 ± 0,04	M. p	4,21 ± 0,03	4,065 ± 0,11
S. l	4,45 ± 0,01	4,310 ± 0,02	S. l	4,60 ± 0,05	4,465 ± 0,01	S. l	4,25 ± 0,06	4,110 ± 0,02

Legenda: S.c 1: *S. cerevisiae* S-23; S.c 2: *S. cerevisiae* *Blanche*; S.c 3: *S. cerevisiae* S-04; P.k: *P. kluyveri*; M.p: *M. pulcherrima*; S.l: *S. ludwigii*.

Análise comparativa dos produtos de fermentação

A composição das diferentes amostras, que na fase final da maturação consiste maioritariamente em dois compostos, glicerol e etanol.

Nas diferentes cervejas analisadas verificou-se que tal como era expectável, no caso da cerveja tipo *Stout* e tipo *Weissbier*, entre o período final de fermentação e o fim da maturação, tanto a concentração de glicerol como a de etanol aumentaram (Stewart, 2006), período em que ocorreu a segunda fermentação alcoólica (após a adição de sacarose) e poderá ter havido algum desvio dos açúcares para produção glicerol. (Tabela 17, Tabela 18 e Tabela 19).

Tabela 17 – Concentração de glicerol e etanol obtidos no final da fermentação e no período após o período de maturação, realizados em mosto de *Dunkel*.

	Glicerol (% m/v)		Etanol (% m/v)	
	Final da fermentação	Produtos Finais	Final da fermentação	Produtos Finais
<i>S.cerevisiae</i> S-23	0,86	0,69	3,57	0,97
<i>P. kluyveri</i>	0,97	1,43	2,87	2,26
<i>M. pulcherrima</i>	0,74	1,22	3,29	1,78
<i>S. ludwigii</i>	0,67	0,91	4,59	1,32

Tabela 18– Concentração de glicerol e etanol obtidos no final da fermentação e no período após o período de maturação, realizados em mosto de *Weissbier*.

	Glicerol (% m/v)		Etanol (% m/v)	
	Final da fermentação	Produtos Finais	Final da fermentação	Produtos Finais
<i>S. cerevisiae</i> <i>Blanche</i>	0,41	1,27	0,53	1,78
<i>P. kluyveri</i>	1,23	1,54	1,81	2,02
<i>M. pulcherrima</i>	0,47	1,56	0,80	2,73
<i>S. ludwigii</i>	0,96	1,04	2,04	1,66

Tabela 19– Concentração de glicerol e etanol obtidos no final da fermentação e no período após o período de maturação, realizados em mosto de *Stout*.

	Glicerol (% m/v)		Etanol (% m/v)	
	Final da fermentação	Produtos Finais	Final da fermentação	Produtos Finais
<i>S.cerevisiae</i> S-04	0,42	1,70	0,54	2,10
<i>P. kluyveri</i>	0,30	0,90	0,66	1,60
<i>M. pulcherrima</i>	0,24	0,40	0,55	0,70
<i>S. ludwigii</i>	0,22	0,70	0,48	0,70

No caso da cerveja tipo *Dunkel*, observou-se um decréscimo não expectável da concentração de etanol. Este resultado, poderá ter origem num consumo de etanol por parte das leveduras ou de uma contaminação por bactérias acéticas. No entanto, ambas as hipóteses são descartadas uma vez que (1) o produto final foi observado ao microscópio não se tendo detetado qualquer tipo de contaminação bacteriana e (2) para haver consumo de etanol que compense aquele que esta a ser produzido na segunda fermentação, teria de haver uma concentração elevada de oxigénio dissolvido, uma vez que este tipo de metabolismo é exclusivamente respiratório, o que não acontece dado que a segunda fermentação se realiza em garrafa hermeticamente encapsulada. Apesar disso, e dado que se observou uma descida mais acentuada do pH no ensaio de *S. cerevisiae* Saflager S-23, poderá ter havido alguma produção de ácido acético a partir do etanol usando o oxigénio dissolvido.

3.6.3. Análise Sensorial dos Produtos Finais

A avaliação sensorial foi realizada com base nas degustações realizadas por um cervejeiro profissional, como tal, não representa uma análise com significância estatística das características sensoriais das diferentes cervejas em análise, mas apenas a análise objetiva de um profissional. As diferentes análises da *Weissbier* e *Stout*, foram realizadas por comparação com produtos de referência, cerveja *Franziskaner Hefe-Weissbier* (no caso de *Weissbier*) e cerveja *Kurofone - The Fisherman* (no caso de *Stout*). No caso da análise da cerveja tipo *Dunkel* não foi feita uma análise comparativa, procurando-se apenas descrever as cervejas em função do conhecimento prévio das características deste tipo de cerveja.

3.6.3.1. Cerveja do estilo *Dunkel*

O primeiro parâmetro a ser avaliado na caracterização sensorial dos diferentes ensaios, foi a aparência, mais concretamente a cor. No que respeita a cor, os quatro tipos de cervejas de mosto *Dunkel* apresentavam cor acastanhada escura, assemelhando-se bastante ao desejado, apesar de o ensaio com *M. pulcherrima* apresentar com a cor ligeiramente mais clara que os restantes (Figura 35). As diferentes cervejas obtidas apresentavam baixa carbonatação e uma quantidade adequada de espuma, sendo o ensaio com *P. kluyveri* aquele que a espuma é mais abundante e mais persistente. Este ensaio destacou-se ainda por ter muito pouco corpo e baixa densidade, enquanto que, por outro lado, a cerveja de *S. ludwigii* apresentou muito mais gás que todos os outros produtos finais.



Figura 35 – Produtos finais obtidos em mosto *Dunkel*. Ensaios inoculados com *S. cerevisiae* S-23 (A); *P. kluyveri* (B); *M. pulcherrima* (C).

A nível de *flavour* as cervejas *Dunkel* não se aproximaram do padrão conhecido para nenhum dos casos, apresentando descritores aromáticos negativos como erva cortada e água estagnada (*S. cerevisiae* S-23); água estagnada e cartão (*P. kluyveri*); levedura e fermento (*M. pulcherrima*), associados a uma componente ácida presente em todos os ensaios, um ligeiro tostado e ausência de "corpo". No caso dos ensaios com *S. cerevisiae* S-23 e *S. ludwigii*, também foi detetada alguma adstringência. Estes resultados levaram a considerar a cerveja produzida muito longe em relação às cervejas *Dunkel* comerciais. Com base na Tabela 20 é possível verificar que as leveduras são as principais responsáveis por grande parte dos *off-flavours* detetados nos produtos finais, mais concretamente o aroma a água estagnada e levedura/fermento, como resultado de processos de autólise durante a fermentação e maturação, e o sabor ácido, como consequência da produção de ácido cítrico durante o metabolismo fermentativo.

Tabela 20– Relação entre os compostos orgânicos e os diferentes *flavours* dos ensaios em mosto *Dunkel*. Adaptado de: 1 (Siebel Institute of Technology, 2017); 2 (FlavourActiv, 2005).

Descritores	Compostos orgânicos	
Erva cortada	Cis-3-hexenol ²	Formação durante a etapa de brassagem; associada à variedade de lúpulo utilizada no processo produtivo.
Ácido	Ácido cítrico ²	Produto secundário do metabolismo das leveduras.
Torrados		Resulta da influência dos tipos de malte.
Água estagnada	Metanotiol ¹	Resulta da autólise das leveduras no final da fermentação.
Cartão	Trans-2-nonenal ¹	Resulta de processos de oxidação nos estágios iniciais do processamento; Processo de maturação realizado a temperaturas mais altas que o ideal.
Levedura/Fermento		Resulta da autólise das leveduras durante o processo de maturação.

3.6.3.2. Cerveja do estilo Weissbier

Nos ensaios conduzidos com cerveja tipo *Weissbier*, verificou-se que um fator comum aos quatro ensaios é o facto de os produtos finais apresentarem pouca carbonatação e pouca espuma. Os ensaios com *S. cerevisiae Blanche*, *M. pulcherrima* e *S. ludwigii* apresentavam uma cor demasiado escura para o estilo de cerveja em causa, sendo que, simultaneamente o ensaio com *S. ludwigii* é aquele que correspondeu à cerveja mais límpida, enquanto que, o ensaio com *P. kluyveri* representou o ensaio cuja cor mais se assemelhou ao desejado (Figura 36).



Figura 36 – Produtos finais obtidos em mosto *Weissbier*. Ensaios inoculados com *S. cerevisiae Blanche* (A); *P. kluyveri* (B); *M. pulcherrima* (C); *S. ludwigii* (D).

As diferentes cervejas foram também avaliadas com base em diferentes parâmetros nomeadamente, *flavour*, aroma e sabor. Ao nível do aroma os ensaios apresentam algumas diferenças, onde o ensaio com *S. cerevisiae Blanche* foi o que apresentou o aroma mais agradável, associado a uma sensação de frescura e a notas de caramelo e fruta madura. Por sua vez, o ensaio com *P. kluyveri* apesar de apresentar um aroma doce, apresentou também notas de água estagnada e mofo, que se desvanecem com a agitação, tornando-a mais bebível. Por último, o ensaio com *M. pulcherrima* apresentou alguma acidez, e aroma a fruta estragada, enquanto que, no ensaio com *S. ludwigii* não foi possível identificar nenhum descritor, isto é, apresenta um aroma neutro.

Ao nível do palato foi possível identificar sensação de frescura e sabor a especiarias no ensaio com *S. cerevisiae Blanche*, e sensação amarga no ensaio com *S. ludwigii*. Os ensaios de *P. kluyveri* e *M. pulcherrima* foram semelhantes, apresentando de uma forma geral, menos complexidade e mais acidez que os restantes ensaios.

Os *off-flavours* das cervejas de mosto *Weissbier*, resultaram de um conjunto de compostos que se formam durante o processo fermentativo e de maturação (Tabela 21). As leveduras são as principais responsáveis por dar origem à componente ácida das cervejas, como resultado da formação de metabólitos secundários ácidos cítricos, e o aroma a água estagnada e fruta podre, consequência de processos de autólise das leveduras no final da fermentação.

Tabela 21 – Relação entre os compostos orgânicos e os diferentes *flavours* dos ensaios em mosto *Weissbier*. Adaptado de: 1(Siebel Institute of Technology, 2017); 2(FlavourActiv, 2005); 3(Marques Oliveira, 2000).

Descritores	Compostos orgânicos	
Caramelo	Furaneol ¹	Resulta da influência do tipo e quantidade de Lúpulo.
Fruta madura	Linalol ¹	Associado aos tempos e temperaturas do processo de fervura; Resulta da influência do tipo e quantidade de uma variedade específica de Lúpulo; Decomposição do composto gerianol.
Ácido	Ácido cítrico ²	Produto secundário do metabolismo das leveduras.
Amargo	Isolone	Resulta da influência do tipo e quantidade de Lúpulo.
Mofo	Trans-4,5-Epoxi (E) decenal ¹	Resulta da influência do tipo e quantidade de Lúpulo.
Água estagnada, Fruta Podre	Metanotiol ¹	Resulta da autólise das leveduras no final da fermentação.

3.6.3.3. Cerveja do estilo *Stout*

As diferentes cervejas, resultantes dos ensaios conduzidos em mosto *Stout*, apresentaram cor acastanhada/avermelhada (mais clara do que o desejado neste tipo de cerveja), alguma carbonatação, onde o ensaio com *M. pulcherrima* destacou-se por ser o único que apresenta espuma persistente (Figura 37).



Figura 37 – Produtos finais obtidos em mosto *Stout*. Ensaios inoculados com *S. cerevisiae* S-04 (A); *P. kluyveri* (B); *M. pulcherrima* (C); *S. ludwigii* (D).

A nível do *flavour*, as diferentes cervejas apresentavam notas aromáticas como chocolates, tostados (*S. cerevisiae* S-04 e *M. pulcherrima*), frescura, caramelo, flores (*P. kluyveri*), e herbáceo (*S. ludwigii*), que podem ser associados à presença de diferentes compostos (Tabela 22). No diz respeito ao sabor, os ensaios apresentavam pouco "corpo" (cerveja aguada), adstringência, tendo sido ainda possível identificar notas de cartão e de especiarias no ensaio com *P. kluyveri*, e a ausência de pico acético no ensaio com *S. ludwigii*.

O perfil sensorial das cervejas depende dos compostos que se vão formando durante todo o seu processo produtivo, cuja origem pode ser variada, e que tende a ser mais complexo no caso das cervejas tipo *Ale* (Tabela 22).

Tabela 22 – Relação entre os compostos orgânicos e os diferentes *flavours* dos ensaios em mosto *Stout*. Adaptado de: 1 (Siebel Institute of Technology, 2017); 2 (Aroxa, 2016).

Descritores	Compostos orgânicos	
Torrados		Resulta da influência dos tipos de malte.
Caramelo	Furaneol ¹	Associado a adição de lúpulo e altas concentrações de variedades específicas de lúpulo.
Flores	Geraniol ¹	Relação com o tipo e quantidade de lúpulo adicionado.
Herbáceo	Aldeído iso-butírico ²	Possível fervura insuficiente do mosto.
Cartão	Trans-2-nonenal ¹	Resulta de processos de oxidação nos estágios iniciais do processamento; Processo de maturação realizado a temperaturas mais altas que o ideal.

3.7. Análise global comparativa dos resultados

Os diferentes mostos foram inoculados com as estirpes comerciais correspondentes, ensaio em mosto *Dunkel* com *S. cerevisiae* *Saflager* S-23, em mosto *Weissbier* com *S. cerevisiae* *Blanche* e o ensaio em mosto *Stout* com a estirpe *S. cerevisiae* *Safale* S-04, no início do ensaio ou após um determinado período (co-inoculação).

Para a avaliação do desempenho das diferentes estirpes, quando inoculadas em mostos distintos, foram selecionados três pontos-chave do processo de fermentação (início, co-inoculação e final da fermentação) e o final da maturação em garrafa. A seleção destes pontos teve por base a escolha daqueles que melhor refletirão as diferenças entre as estirpes: (1) antes e depois da co-inoculação (efeito das estirpes não convencionais, uma vez que ainda não ocorreu a inoculação com a estirpe comercial - Fase I), (2) entre a co-inoculação e o final da fermentação (efeito conjugado da estirpe não convencional e da estirpe comercial - Fase II) e (3) entre o final da fermentação e o final da maturação (efeito das estirpes no processo de maturação - Fase III). De realçar que neste último período, os processos são maioritariamente conduzidos pela estirpe comercial, estirpe dominante no final da fermentação, pelo que neste caso não são de esperar diferenças relevantes entre os diferentes ensaios.

À semelhança do realizado nos subcapítulos 4.3, 4.4, 4.5 e 4.6, esta análise centrou-se nos parâmetros microbiológicos, avaliando o estado fisiológico das células das várias estirpes, e nos parâmetros físico-químicos, que foram apresentados anteriormente, procurando-se neste caso reorganizar os dados de forma a facilitar a comparação em função da estirpe. Análise comparativa da evolução da viabilidade, da turvação, da concentração de proteína, do pH, do °Brix, e da densidade. No Anexo IV encontram-se detalhados os resultados obtidos nos diferentes ensaios, face aos diversos parâmetros avaliados.

3.7.1. Parâmetros Microbiológicos e Físico-químicos

Em qualquer dos mostos, foi possível observar um aumento gradual da densidade populacional ao longo de todo o processo fermentativo (Fase I e Fase II) (Figura 38), à exceção do ensaio com mosto *Weissbier* inoculado com *P. kluyveri* onde se observou uma diminuição quer a densidade populacional da estirpe, quer da sua viabilidade total relativa, no período inicial de fermentação (antes da co-inoculação), retomando o crescimento após esta fase, provavelmente reflexo do aumento populacional da estirpe comercial entretanto inoculada. No caso do mosto *Stout*, observou-se um efeito oposto, com a estirpe de *P. kluyveri* apresentando a maior viabilidade no momento da co-inoculação (Figura 38A).

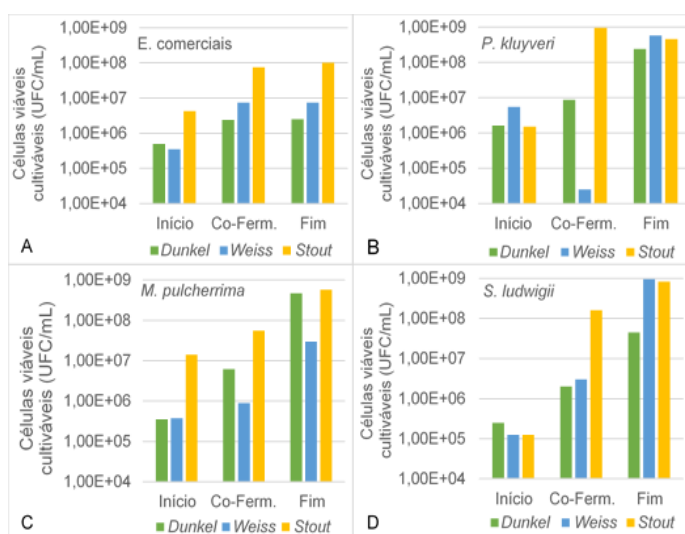


Figura 38- Viabilidade das diferentes estirpes quando inoculadas nos três mostos. Ensaios inoculados com as estirpes comerciais (A); *P. kluyveri* (B); *M. pulcherrima* (C); *S. ludwigii* (D).

A turvação e a concentração de proteína solúvel, à semelhança de outros parâmetros, depende das características do mosto e da ação das leveduras, o que justifica a heterogeneidade dos valores iniciais no arranque da fermentação, não sendo possível, portanto, estabelecer uma relação entre o número de células e as diferenças que se verificam nos valores finais destes parâmetros, que deverão refletir as características de cada mosto (Figura 39 e Figura 40).

No caso dos mostos *Stout* e *Weissbier*, observou-se uma diminuição da turvação, entre o início e o momento da co-inoculação, para todas as estirpes, o que não acontece no mosto *Dunkel* inoculado com as estirpes não-convencionais. Após esta diminuição inicial, observou-se um aumento da turvação, entre este ponto e o final da fermentação, mais evidenciado nos ensaios em mosto *Weissbier* inoculado exclusivamente com *S. cerevisiae* e com a estirpe *M. pulcherrima* (Figura 39A e Figura 39C), e no ensaio em mosto *Stout* com a estirpe *S. ludwigii* (Figura 39D). Este aumento pode ser resultado de um efeito conjugado do crescimento da população (número de células totais) e da precipitação de proteínas. Durante o período de maturação, os ensaios conduzidos nos diferentes mostos apresentaram, de forma geral, uma diminuição dos valores de

turvação, em reflexo da deposição de células e proteínas precipitadas que ocorre durante este tempo que pode resultar no aumento da limpidez da cerveja final.

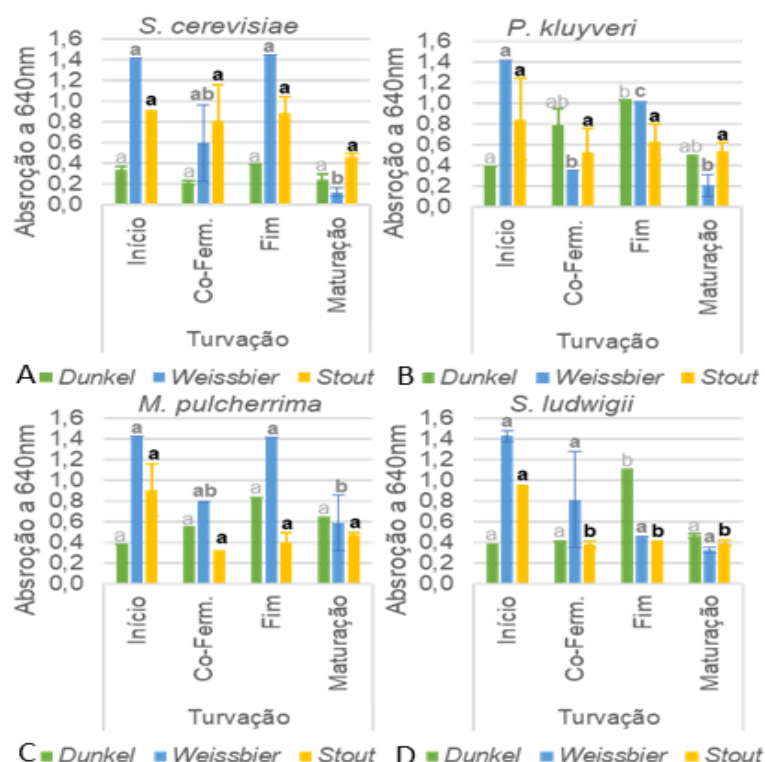


Figura 39 - Variação da turvação registada nos ensaios inoculados com as diferentes estirpes. A) estirpes comerciais; B) *P. kluyveri*; C) *M. pulcherrima*; D) *S. ludwigii*. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Simultaneamente à variação da turvação, verificou-se que na maioria dos ensaios, ao longo da fermentação e maturação não ocorreram alterações significativas da concentração de proteína, à exceção dos ensaios conduzidos em mosto *Stout* inoculados exclusivamente com a estirpe comercial (Figura 40A), e com estirpe *M. pulcherrima* e em mosto *Weissbier* quando inoculado com *M. pulcherrima* (Figura 40C).

No período de maturação verificou-se uma diminuição dos valores da concentração de proteína em todos os ensaios realizados em mosto *Weissbier*, significativa apenas no ensaio inoculado com *M. pulcherrima*, por oposição ao aumento registado nos restantes ensaios, como possível resultado de um aumento de fenómenos de autólise e consequente libertação do conteúdo intracelular das células.

Durante a fermentação, e posteriormente na refermentação que ocorre no período de maturação, tal como já foi anteriormente referido, o metabolismo celular das leveduras conduz a uma diminuição dos valores de pH, como resultado da produção de metabolitos secundários (ácidos fracos), e a uma diminuição dos valores de °Brix, como consequência do consumo de açúcares ao longo de todo o processo, que se reflete também na diminuição da densidade do mosto.

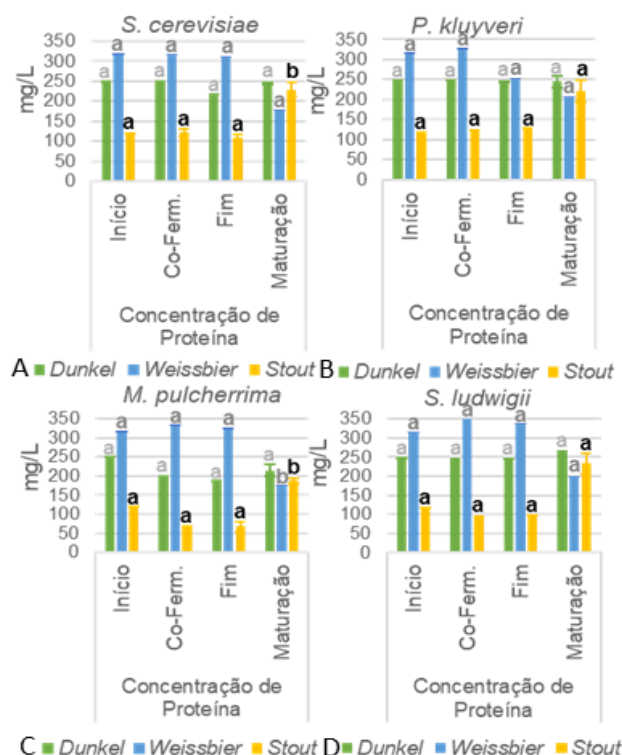


Figura 40- Variação da concentração de proteína solúvel registrada nos ensaios inoculados com as diferentes estirpes. A) estirpes comerciais; B) *P. kluyveri*; C) *M. pulcherrima*; D) *S. ludwigii*. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

A evolução dos valores de pH e de densidade foi bastante semelhante para os diferentes ensaios ao longo do processo de fermentação. Na Fase I os valores de pH diminuíram, seguindo-se a estabilização dos valores, até ao fim do processo de maturação (Figura 41). Durante a fermentação, na generalidade dos ensaios os valores de densidade vão diminuindo progressivamente, com maior intensidade na terceira fase, no fim do período de maturação (Figura 42).

Relativamente aos valores de °Brix, existem algumas semelhanças no comportamento das diferentes estirpes quando inoculadas em diferentes mostos, com exceção dos ensaios em mosto *Stout* se destacam por apresentar uma maior estabilidade ao longo da fermentação e maturação em relação aos restantes (Figura 41). Na Fase I registou-se a diminuição dos valores, na maioria dos ensaios apresentando diferenças significativas entre os valores destes primeiros dois pontos. No período após a introdução do co-inóculo até ao fim da fermentação os valores tenderam a diminuir ou a estabilizar, verificando-se apenas diferenças significativas nos ensaios em mosto *Weissbier*. Na última fase, de uma forma geral, ocorreu uma diminuição dos valores de °Brix nos diferentes ensaios, sem apresentar diferenças significativas entre o fim da fermentação e o fim da maturação.

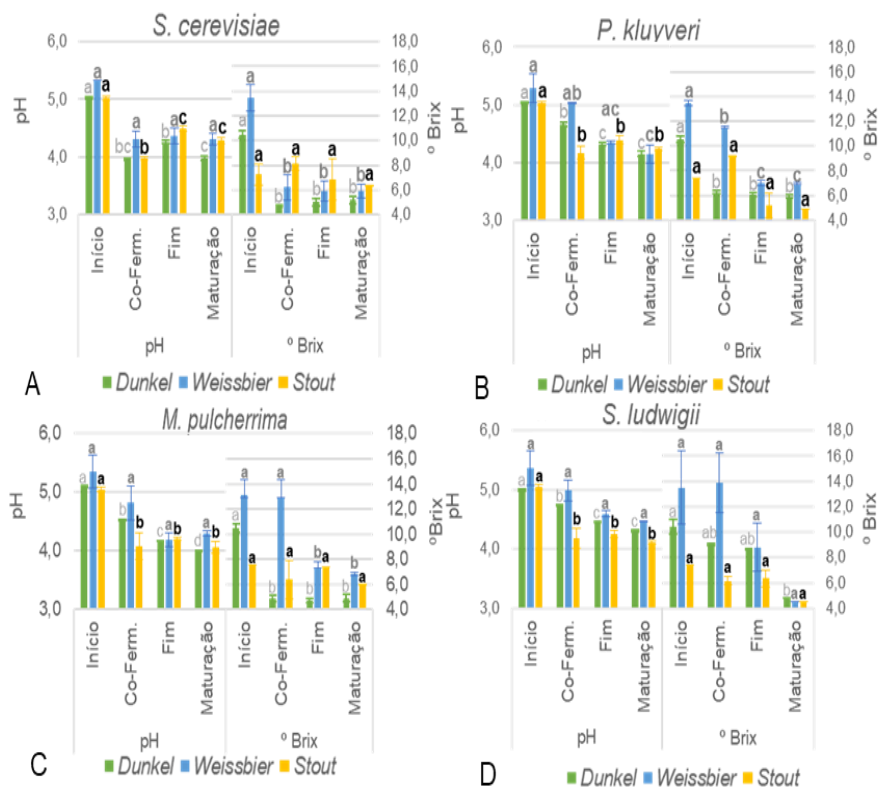


Figura 41 - Variação dos valores de pH e °Brix registrada nos ensaios inoculados com as diferentes estirpes. A) estirpes comerciais; B) *P. kluyveri*; C) *M. pulcherrima*; D) *S. ludwigii*. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

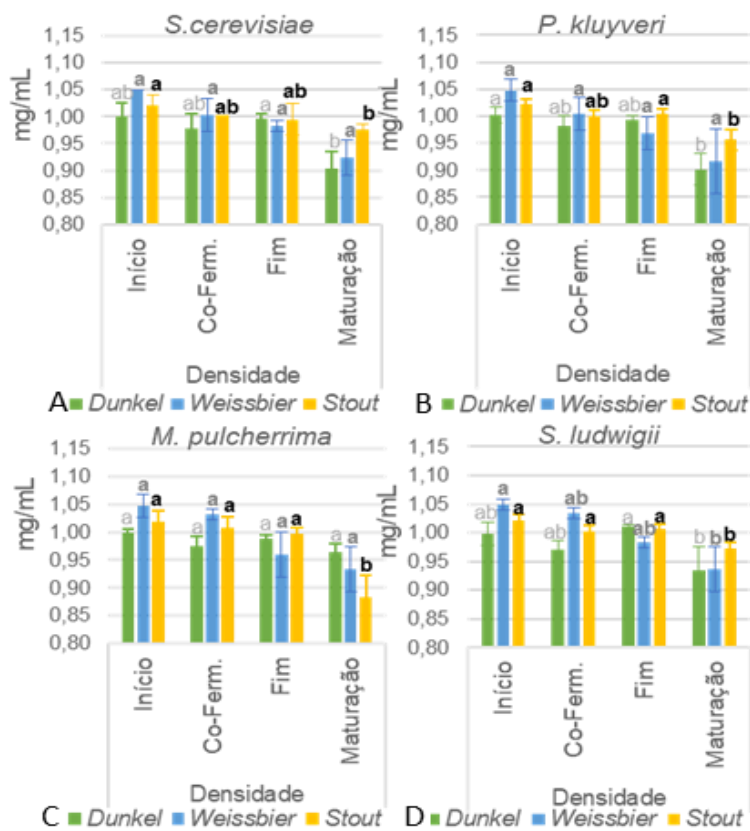


Figura 42 - Variação dos valores de densidade registrada nos ensaios inoculados com as diferentes estirpes. A) estirpes comerciais; B) *P. kluyveri*; C) *M. pulcherrima*; D) *S. ludwigii*. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

3.7.2. Análise comparativa da evolução dos metabolitos de fermentação

Tal como foi anteriormente referido, os diferentes períodos selecionados (início-co-inoculação (Fase I), co-inoculação-fim da fermentação (Fase II) e fim da fermentação-fim da maturação (Fase III)) refletem respetivamente o efeito das estirpes não convencionais, das estirpes não-convencionais em conjugação com a estirpes comercial e maioritariamente da estirpe comercial.

Analisando comparativamente os resultados obtidos para o consumo de açúcares nos ensaios com as várias estirpes (Figura 43), observou-se em todos os casos a diminuição gradual dos açúcares disponíveis até ao final da fermentação. Nos três mostos os açúcares são consumidos de forma sequencial, verificando-se que a glucose correspondeu ao primeiro, e único que é completamente consumido em todos os ensaios, seguindo-se a maltose, e por fim a maltotriose, sendo este mais eficaz quando os mostos são inoculados com as estirpes comerciais (Fase I, no caso da inoculação exclusivamente com as estirpes comerciais e Fase II, com a introdução das estirpes comerciais). Comparando o efeito das estirpes não-convencionais (Fase I), os resultados indicam que *S. ludwigii* foi a estirpe que fermentou mais eficientemente que a glucose quer a maltose. De referir ainda que, o ensaio em *Dunkel* inoculado unicamente com a estirpe comercial *S. cerevisiae* S-23, foi o único onde a maltotriose se esgota na primeira fase (Figura 43A).

Estes resultados refletem as diferenças entre as estirpes utilizadas, uma vez que, no caso da cerveja *Weissbier* e *Stout*, se utilizaram estirpes de tipo *Ale*, que não têm capacidade relevante de consumir a maltotriose, ao passo que, no caso da cerveja tipo *Dunkel* a estirpe *S. cerevisiae* S-23, é uma estirpe de tipo *Lager* (*S. pastorianus*) a qual é expectável que consuma a maltotriose de forma eficiente.

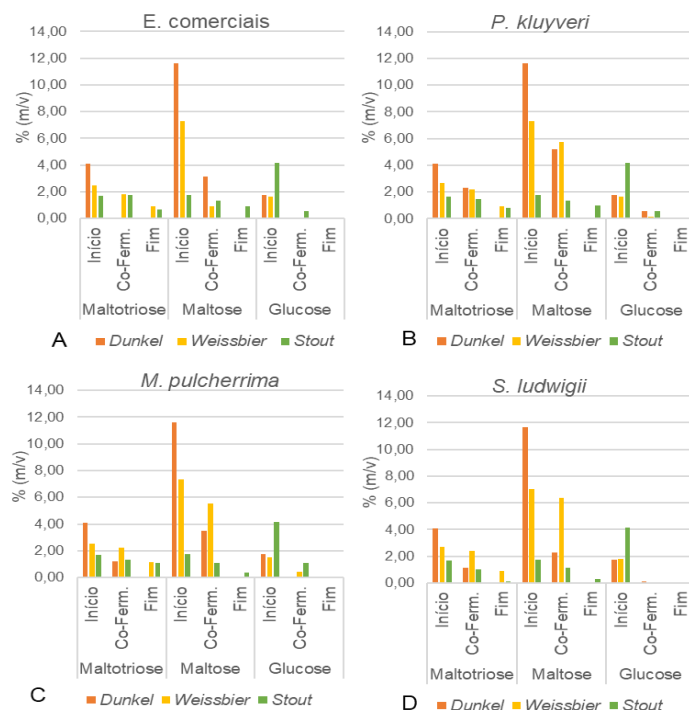


Figura 43- Variação da concentração dos metabolitos de fermentação registados nos ensaios inoculados com as diferentes estirpes. A) estirpes comerciais; B) *P. kluyveri*; C) *M. pulcherrima*; D) *S. ludwigii*.

Por outro lado, e tal como foi demonstrado em 4.1, as estirpes de *P. kluyveri*, *M. pulcherrima* e *S. ludwigii* também não são capazes de fermentar maltose, no entanto, é possível observar que existiu consumo deste açúcar no período inicial da fermentação (Figura 43B, Figura 43C, Figura 43D). Estes resultados estão de acordo com Meier-Dörnberg *et al.* (2016), que indica, que apesar das limitações que algumas estirpes apresentam na metabolização destes açúcares, pode existir um consumo mínimo (dependendo das condições de pH e de concentração de açúcares do mosto) (Meier-Dörnberg *et al.*, 2016).

Os produtos de fermentação refletem o consumo de açúcares referido, verificando-se que no final da Fase I, os ensaios que apresentaram maior concentração de etanol são aqueles onde o consumo de açúcares foi mais eficiente, ou seja, os casos em que o inóculo foi exclusivamente a estirpe comercial (Figura 44). Em relação ao glicerol, os valores são relativamente baixos nesta fase.

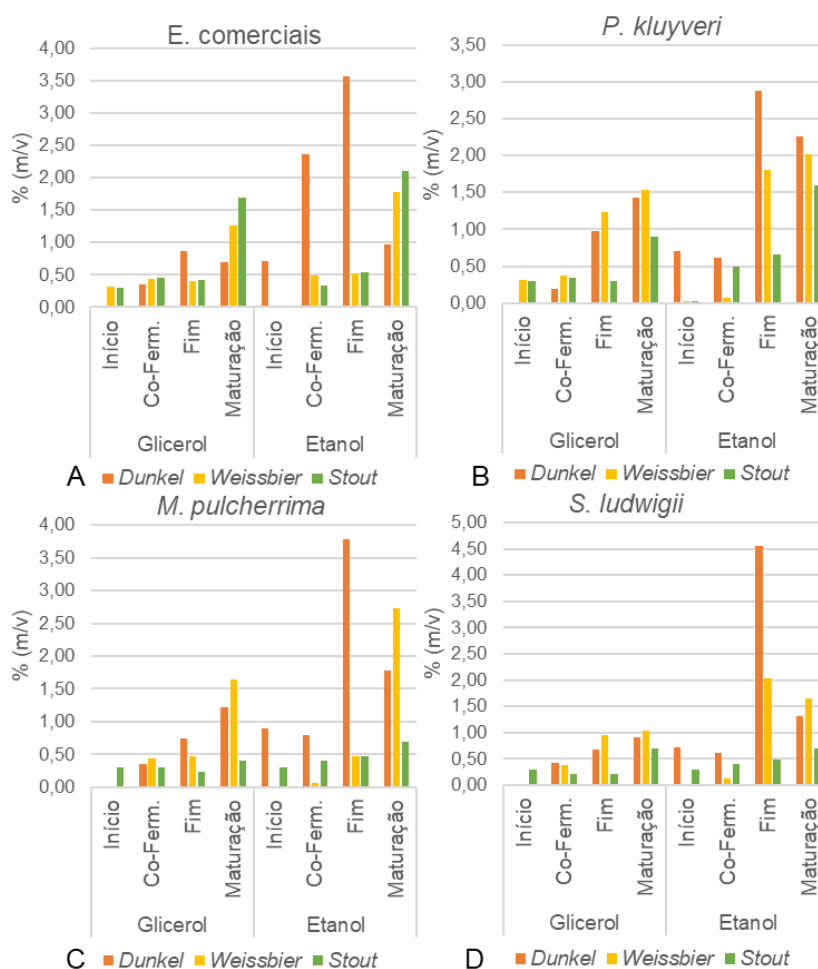


Figura 44- Variação da concentração de glicerol e etanol registados nos ensaios inoculados com as diferentes estirpes. A) estirpes comerciais; B) *P. kluyveri*; C) *M. pulcherrima*; D) *S. ludwigii*.

Na Fase III, os resultados são maioritariamente reflexo da estirpe comercial dominante, apesar disso, existem algumas diferenças a realçar. Nos ensaios realizados em mosto *Stout* e *Weissbier*, observaram-se dois comportamentos distintos na Fase III. No ensaio apenas com a estirpe comercial e no ensaio de *M. pulcherrima*, tal como esperado, a maior parte do etanol e glicerol produzido apareceu na fase de maturação (Fase III), uma vez que, durante a segunda fermentação em garrafa o sistema esta completamente fechado, não havendo fenómenos levem à diminuição destes compostos. Por outro lado, este aumento tão acentuado nesta fase não se verificou nos ensaios inoculados com *P. kluyveri* e *S. ludwigii*, que correspondem àqueles em que a concentração de etanol e glicerol é mais elevada no final da fermentação.

No caso da cerveja *Dunkel*, e tal como já foi referido anteriormente, os resultados não são consistentes com o esperado, uma vez que se observa uma diminuição da concentração de etanol na Fase III.

Após a co-inoculação, verifica-se um comportamento semelhante entre os mostos inoculados com *P. kluyveri* e *S. ludwigii*, com o etanol a aumentar consideravelmente na Fase II (Figura 44B e Figura 44D). Por outro lado, no ensaio com *M. pulcherrima* apenas no caso da cerveja *Dunkel* se observou um aumento notório da concentração de etanol, terminando esta fase com valores semelhantes aos observados quando inoculado exclusivamente com a estirpe comercial. Nesta etapa, observou-se igualmente um aumento da concentração de glicerol, mais relevante no caso dos ensaios com as estirpes não convencionais.

4. Conclusões Gerais

Dado o crescente interesse a que o setor das cervejas artesanais tem vindo a ser alvo, é cada vez mais pertinente o seu desenvolvimento, procurando sempre adequar o produto final às preferências dos consumidores. Nesse sentido, ao longo dos tempos, têm vindo a ser apresentadas inovações quer ao nível do melhoramento do processo produtivo quer da matéria prima (tipo/quantidade), ao nível do malte, dos lúpulos e das estirpes de levedura.

As cervejas obtidas no final da fermentação e maturação resultam da interação entre a capacidade fermentativa das leveduras e as características individuais associadas a cada um dos mostos selecionados no presente estudo. A introdução de leveduras não-convencionais ainda é uma temática pouco explorada, mas já é clara a importância que esta matéria-prima apresenta no processo produtivo, e consequentemente, no produto final. Cada vez mais têm vindo a ser realizados estudos no sentido de otimizar o desempenho fermentativo das estirpes convencionais e de incorporar espécies não-*Saccharomyces* no processo produtivo, proporcionando uma maior eficiência de processo e diversidade das características sensoriais do produto final. O presente trabalho enquadra-se nesta última abordagem.

Os ensaios realizados foram acompanhados ao longo de todo o processo fermentativo e no final da etapa de maturação, através da avaliação de parâmetros microbiológicos, físicos e químicos. Em termos gerais, os processos de fermentação foram bem-sucedidos, uma vez que ocorreu o consumo total dos açúcares e o aumento da concentração de etanol. Entre o início e o fim da fermentação, o número de células metabolicamente ativas aumentou, e em todos aqueles inoculados com estirpes não convencionais ocorreu uma dominância da estirpe comercial em detrimento da estirpe inicialmente inoculada. Apesar desta dominância, observaram-se diferenças entre as cervejas obtidas com as várias estirpes e entre estas e a cerveja padrão inoculada apenas com as estirpes comerciais, o que nos leva a concluir que o processo de co-inoculação sequencial permite refletir também as características das estirpes não convencionais proporcionando maior diversidade.

Comparando os vários mostos quando inoculados com as mesmas estirpes, o comportamento dos diferentes ensaios face aos parâmetros físico-químicos e sensoriais difere entre eles, refletindo a influência em simultâneo das características individuais dos mostos selecionados, da ação metabólica da levedura e das condições em que foram realizados os processos de fermentação e de maturação.

De realçar ainda que em termos de evolução destes parâmetros se verificou que no caso das cervejas tipo *Dunkel* e *Stout* a influência da estirpe comercial é muito menos notória que no caso das cervejas tipo *Weissbier*. Nesta última os resultados de °Brix, pH e consumo de açúcares e produção de produtos de fermentação depende da presença da estirpe comercial.

Dada a importância dos aspetos sensoriais para a futura divulgação/comercialização de novas cervejas seria, no entanto, aconselhável fazer uma análise mais aprofundada aos metabolitos

presentes nomeadamente os compostos voláteis com contribuem para o aroma, que poderia ser conseguida através de uma análise de “espaço-de-cabeça” por Cromatografia Gasosa. Para além disso, e com o objetivo referido anteriormente, deveria ser realizada uma análise sensorial mais extensa, quer com um painel de provadores treinado (com vista à caracterização sensorial) quer com um painel de potenciais consumidores (com vista a avaliar o grau de aceitação e apetência de compra). Apesar disso, é possível afirmar que os objetivos do presente trabalho foram maioritariamente alcançados, contribuindo para a melhor perceção do metabolismo fermentativo das diferentes estirpes não convencionais em sistema de co-fermentação com *S. cerevisiae*, e consequentemente, da sua influencia nos diferentes produtos finais obtidos.

Face aos resultados obtidos e aos trabalhos que têm sido recentemente publicados, o trabalho desenvolvido poderá ser um ponto de partida para estudos futuros e um termo de comparação com trabalhos a realizar com outros mostos e outras estirpes. Seria por exemplo interessante (1) combinar as características de várias estirpes não-convencionais, usando mais do que uma em cada fermentação, (2) aumentar o tempo de fermentação prévio à inoculação com a estirpe comercial de forma a potenciar mais as diferenças aportadas pela estirpe não-convencional e (3) realizar outras fermentações com mostos e lúpulos de características diferentes, nomeadamente de estilo *Lager* no sentido de proporcionar maior complexidade.

5. Bibliografia

- Albergaria, H., Francisco, D., *et al.* (2010). *Saccharomyces cerevisiae*. CCMI 885 secretes peptides that inhibit the growth of some non-*Saccharomyces* wine-related strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol. 86, p. 965–972.
- Analistic Software (2009). Analysis Program - Statistix 9.0.
- Arthur, J.W., (2014). Beer through the Ages. *Anthropology Now*. Vol.6, p.1–11.
- Balança Alimentar Portuguesa 2012-2016 (2017). Instituto Nacional de Estatística. Lisboa.
- Bamforth, C.W. (2003). Beer: Tap into the art and science of brewing. *Journal of Chemical Information and Modeling*. p.160.
- Bamforth, C.W., (2004). Health and nutrition. Blackwell Publishing. Vol.1, p.199.
- Bamforth, C.W. (2006). *Brewing New technologies*, 1ª edição. CRC Press. Woodhead Publishing. Cambridge. p.484.
- Basso, R.F., Alcarde, A.R. (2016). Could non-*Saccharomyces* yeasts contribute on innovative brewing fermentations?. *Food Research International*. Vol.86, p.112–120.
- Belitz, H., Grosch, W., Schieberl, P. (2009). *Food Chemistry*, 4ª edição. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Bolotin-Fukuhara, M. (2006). Genomics and Biodiversity in Yeasts. in: Hagler, A.N. (Ed.), *The Yeast Handbook - Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. Springer, Berlin, p.578.
- Boulton, C., Quain, D. (2001). *Brewing Yeast and Fermentation*, 1ª edição. Blackwell Publishing Ltd, Oxford. p.656.
- Boundy-Mills, K.; Stratford, M.; Miller, M.W. (2011). *Saccharomycodes E.C.* in: Hansen. Kurtzman, C., Fell, J.W., Boekhout, T. (Eds.), *The Yeast - A Taxonomic Study*. Elsevier B.V., Londres. Vol.2, p.474–751.
- Briggs, D.E.; Boulton, C.; Brookes, P.; Stevens, R. (2004). *Brewing Science and Practice*, Woodhead Publishing Limited. p.181.
- Brányik, T.; Silva, D.; Baszczynski, M.; Lehnert, R.; Silva, J.B. (2015). A review of methods of low alcohol and alcohol-free beer production. *Journal of food engineering*. Vol.108, 4, p.493-506.
- Buchanan, R.L.; Doyle, M.P. (2007). *Food microbiology - Fundamentals and Frontiers*. ASM Press, Washington, DC. p.1078.
- Budroni, M., Zara, G., Ciani, M., Comitini, F., 2017. *Saccharomyces* and Non- *Saccharomyces* Starter Yeasts, in: Kanauchi, M. (Ed.), *Brewing Technology*. InTechOpen, pp. 82–97.

Cabras, I.; Higgins, D.M. (2016). Beer, brewing, and business history. *Business History*. Vol.58, p.609–624.

Callejo, M. J.; González, C.; Morata, A. (2017). Use of Non-Saccharomyces Yeasts in Bottle Fermentation of Aged Beers. in: Kanauchi, M. (Ed.), *Brewing Technology*. InTechOpen. p.208.

Chantasuban, T. (2016). Assessing the Wine Yeast *Metschnikowia pulcherrima* for the Production of 2-Phenylethanol. Dissertação para a obtenção do grau de doutorado. Department of Chemical Engineering. University of Bath, Inglaterra.

Coote, N.; Kirsop, B.H. (1976). Factors responsible for the decrease in pH during beer fermentations. *Journal of the Institute of Brewing*. Vol. 82, p.149–153.

Coghe, S.; D'Hollander, H.; Verachtert, H.; Delvaux, F. (2005). Impact of Dark Specialty Malts on Extract Composition and Wort Fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*. Vol.111, p. 51-60.

De Keukeleirc, D. (2000). Fundamentals of beer and hop chemistry. *Química Nova*. Vol.23, p.108–112.

De León-Medina, P. M.; Elizondo-González, R.; Damas-Buenrostro, L.; Geertman, J.; Van den Broek, M.; Galán-Wong, L.; López, R.; Pereyra-Alfárez, B. (2016). Genome annotation of a *Saccharomyces* sp. lager brewer's yeast. *Genomics Data*. Vol.9, p.25–29.

Dietvorst, J.; Londesborough, J.; Steensma, H. (2005). Maltotriose utilization in lager yeast strains: MTTI encodes a maltotriose transporter. *Yeast*. Vol. 22. p.775–7.

Do, T.; Cozzolino, D.; Muhlhausler, B.; Box, A.; Able, A.J. (2015). Effect of malting on antioxidant capacity and vitamin E content in different barley genotypes. *Journal of the Institute of Brewing*. Vol.121, p.531–540.

Eaton, B (2006). An Overview of Brewing, in: Priest, F.G., Stewart, G. (Eds.), *Handbook of Brewing*. CRC Press, Boca Raton. p.715-727.

Eblinger, H.M. (2009). *Handbook of Brewing – Processes, Technology, Markets*. Wiley-VCH. Weinheim. p.709.

Flagfeldt, D.; Siewers, V.; Huang, L.; Nielsen, J. (2009). Characterization of chromosomal integration sites for heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. Vol.26, p.545–551.

FlavourActiv (2005). *Flavour Standtard Products. The beer flavour handbook*. Craft Beer Sensory Kits.

Fleet, G. (1993). The Microoorganisms of Winemaking - Isolation, enumeration and identification, in: Francis, T.& (Ed.), *Wine Microbiology and Biotechnology*. CRC Press, Sydney, Australia. p.510.

Francesco, G.; Turchetti, B.; Sileoni, V.; Marconi, O.; Perretti, G. (2015). Screening of new strains of *Saccharomyces ludwigii* and *Zygosaccharomyces rouxii* to produce low-alcohol beer. *Journal of the Institute of Brewing*. Vol.121, p.113–121.

Garcia, M.M.E. (2017). Produção de cerveja: Utilização de estirpes não-convencionais em co-fermentação com *Saccharomyces* para potenciação do perfil sensorial de diversos tipos de cerveja. Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre no Mestrado em Engenharia Alimentar. Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa.

Goldammer, T. (2008); *The Brewer's Handbook*, 2ª edição. Apex Publishers. U.S.A. p.496.

Goold, H.D.; Kroukamp, H.; Williams, T.C.; Paulsen, I.T.; Varela, C.; Pretorius, I.S. (2017). Yeast's balancing act between ethanol and glycerol production in low-alcohol wines. *Microbial Biotechnology*. Vol.10, p.264–278.

Government, F.C.; International, S.G.; Ceccarelli, S. (2011). Barley Breeding History, Progress, Objectives, and Technology. in: Ullrich, S.E. (Ed.), *Barley: Production, Improvement, and Uses*. Wiley-Blackwell. Vol.8, p.640.

Guido, L.F.; Moreira, M.M. (2013). "Malting". Em: *Engineering Aspects of Cereal and Cereal-Based Products*. CRC Press. Boca Raton. pp. 51-70.

Hornsey, I. (2003). *A History of Beer and Brewing*, 1ª edição, RSC Paperbacks. The Royal Society of Chemistry, Cambridge.

Hughes, P.S.; Baxter, E.D. (2001). An overview of the malting and brewing processes. *The Royal Society of Chemistry, In beer: quality, safety and nutritional aspects*. Cambridge, UK. p. 1-13.

Invernizzi, F. (2016). Production and characterization of an alcoholic fermented beverage from grape must and beer wort. Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre no Mestrado Vinífera Euromaster. Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa.

Kántor, A.; Hutková, J.; Petrová, J.; Hleba, L.; Kačániová, M. (2015). Antimicrobial activity of pulcherrimin pigment produced by *Metschnikowia pulcherrima* against various yeast species. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. Vol.5, p.282–285.

Kobayashi, M.; Shimizu, H.; Shioya, S. (2008). Beer Volatile Compounds and Their Application to Low-Malt Beer Fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. Vol.106, p.317–323.

Krogerus, K.; Magalhães, F.; Vidgren, V.; Gibson, B. (2015). New lager yeast strains generated by interspecific hybridization. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*. Vol.42, p.769–780.

Kunze, W. (2004). *Technology Brewing and Malting*. 3ª edição, VLB. Berlim. p.960.

Kurtzman, C. (2011a). *The Yeast - A Taxonomic Study*, 5ª edição. Elsevier B.V., Londres. Vol.1, p.289.

Kurtzman, C. (2011b). *Pichia* E.C. Hansen, in: Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T. (Eds.), *The Yeast - A Taxonomic Study*. Elsevier B.V. Vol.2, cap.57, p.685–709.

Lettisha, H., Balakrishna, P., Ademola, O.O. (2013). Stability profile of flavour-active ester compounds in ale and lager beer during storage. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 12, p.491–498

Lewis, M.J., Bamforth, C.W. (2006). *Essays in Brewing Science*, 1ª edição. Springer Science+Business Media, LLC, California. p.171.

Lewis, M.J., Young, T.W. (2002). *Brewing*, 2ª edição. Plenum Publisher, Boston. p.375.

Lodolo, E.J.; Kock, J.L.F. Axcell, B. C.; Brooks, M. (2008). The yeast *Saccharomyces cerevisiae* - The main character in beer brewing. *FEMS Yeast Research*. Vol.8, p.1018–1036.

Maicas, S., Mateo, J.J. (2015). Enzyme Contribution of Non- *Saccharomyces* Yeasts to Wine Production. *Universal Journal of Microbiology Research*. Vol.3, p.17–25.

Marques Oliveira, J.M., (2000). Aroma varietais e de fermentação determinantes da tipicidade das castas loureiro e alvarinho. Dissertação para a obtenção do Grau de Doutorado. Universidade do Minho.

Martins, V.; Rodrigues M.A. (2015). Produção e Tecnologia de cereais: processo de maltagem da cevada. Atas das jornadas de Lúpulo e Cerveja. Centro de Investigação de Montanha, Bragança. pp. 37-51.

Meier-Dörnberg, T.; Schneiderbanger, H.; Jacob, F.; Hutzler, M. (2016). Alcohol-Free Wheat Beer with Maltose Negative Yeast Strain *Saccharomycodes ludwigii*. Research Center Weihenstephan for Brewing and Food Quality, TU München, München.

Meussdoerffer, F.G. (2009). A Comprehensive History of Beer Brewing, in: Esslinger, H.M. (Ed.), *Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets*. WILEY-VCH, Weinheim. p.778.

Michel, M.; Meier-Dörnberg, T.; Jacob, F.; Methner, F.; Wagner, R. S.; Hutzler, M. (2016). Review : Pure non- *Saccharomyces* starter cultures for beer fermentation with a focus on secondary metabolites and practical applications. *Journal of the Institute of Brewing*. p. 569–587.

Moller, K.; Bro, C.; Piskur, J.; Nielsen, J.; Olsson, L. (2002). Steady-state and transient-state analyses of aerobic fermentation in *Saccharomyces kluyveri*. *FEMS Yeast Research*. Vol.2, p.233–244.

Morneau, A.D.; Zuehlke, J.M.; Edwards, C. G. (2011). Comparison of media formulations used to selectively cultivate *Dekkera/Brettanomyces*. *Letters in Applied Microbiology*. Vol.53, p.460–465.

Mousia, Z.; Balkin, R.C.; Pandiella, S. S.; Webb, C. (2004). The effect of milling parameters on starch hydrolysis of milled malt in the brewing process. *Process Biochemistry*. Vol.39, p.2213–2219.

- Okafor, N. (2009). Production of Alcoholic Beverages, in: Doelle, H.W., Bevoric, M., Rokem, S. (Eds.), BIOTECHNOLOGY - Industrial Biotechnology. Eolss Publishers, Nigeria, p.255.
- O'Rourke, T. (2002). Technical summary: The role of pH in brewing. The Brewer International. Vol.2, p. 21–23.
- Oro, L.; Ciani, M.; Comitini, F. (2014). Antimicrobial activity of *Metschnikowia pulcherrima* on wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology*. Vol.116, p.1209–1217.
- Palmer, J. (2006). How to brew - Everything you need to know to brew beer right the first time, 3ª edição. Brewers Publications. Ray Daniels, Colorado, USA. p.248.
- Pereira, M.O. (2016). Otimização energética de maltagem a menor temperatura de estufagem. Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Química. Faculdade de Ciências Universidade do Porto.
- Petruzzi, L.; Rosaria Corbo, M.; Sinigaglia, M.; Bevilacqua, A. (2016). Brewer's yeast in controlled and uncontrolled fermentations, with a focus on novel, nonconventional, and superior strains. *Food Reviews International*. Vol.32, p.341–363.
- Pfeiffer, T.; Morley, A. (2014). An evolutionary perspective on the Crabtree effect. *Frontiers in Molecular Biosciences*.
- Pires, E.J.; Teixeira, J.A.; Brányik, T.; Vicente, A. A.. (2014). Yeast: The soul of beer's aroma - A review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol.98, 5, p.1937–1949.
- Polaina, J. (2002). Brewer's Yeast: Genetics and Biotechnology, in: Dilip K. Arora, R.M.B. and G.B.S. (Ed.), *Applied Mycology and Biotechnology Elsevier B.V.* Vol.2, p.17.
- Portaria no1/96 (1996). *Diário da República*. p.8–9.
- Quirós, M.; Rojas, V.; Gonzalez, R.; Morales, P. (2014). Selection of non-Saccharomyces yeast strains for reducing alcohol levels in wine by sugar respiration. *International Journal of Food Microbiology*. Vol.181, p.85–91.
- Roche Diagnostics (2004). Bula Teste Keto-Diabur-5000.
- Scanes, K.T.; Hohmann, S.; Prior, B.A. (1998). Glycerol production by the yeast *Saccharomyces* and its relevance to wine. *South African Journal of Enology and Viticulture*. Vol.19, p.8.
- SICAD. Serviço de Intervenção nos Comportamentos Aditivos e nas Dependências (2016). Relatório anual 2015 - A situação do País em Matéria de Álcool, Lisboa.
- Steensels, J.; Verstrepen, K.J. (2014). Taming Wild Yeast: Potential of Conventional and Nonconventional Yeasts in Industrial Fermentations. *Annual Review of Microbiology*. Vol.68, p.61–80.

- Steiner, E.; Auer, A.; Becker, T.; Gastl, M. (2011). Comparasion of beer quality attributes between beers brewed with 100% barley alt and 100% barley raw material. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. Vol. 92, p.803-813.
- Steiner, E.; Becker, T; Gastl, M. (2010). Turbidity and Haze Formation in Beer – Insights and Overview. *Journal of the Institute of Brewing*. Vol.116, p.360–368.
- Stewart, G. (2006). Beer Stability, in: Priest, F.G., Stewart, G. (Eds.), *Handbook of Brewing*. CRC Press, Boca Raton. p.715-727.
- Strong, G.; England, K. (2015). Beer Judge Certification Program 2015. Style Guidelines. Beer Judge Beer Judge Certification Program. p-93
- Stumbo, C.R. (1973). *Thermobacteriology in Food Processing*, 2ª edição. Academic Press, Massachusetts. p.327.
- Tortora, G.J.; Funke, B.R.; Case, C. L. (2005). *Microbiologia*, 8ª edição. Artmed Editora.S.A, Brasil.
- Unger, R. W. (2007). *Beer in the Middle Ages and the Renaissance*, 3ª edição. University of Pennsylvania Press. p.334.
- Vidgren, V. (2010). Maltose and maltotriose transport into ale and lager brewer's yeast strains. VTT Publ. Dissertação para a obtenção do grau de Doutorado. Faculty of Biological and Environmental Sciences. University of Helsinki, Finland.
- Walker, G.; Stewart, G. (2016). *Saccharomyces cerevisiae in the Production of Fermented Beverages*. Beverages. Vol.2, p.30.
- Warpala, I.W.S.; Pandiella, S.S. (2000). Grist fractionation and starch modification during the milling of malt. *Food Bioprod. Process*. Vol.78, p.85–89.
- White, C.; Zainasheff, J. (2010). *Yeast: The Practical Guide to Beer Fermentation*, 1ª edição. Kristi Switzer, United States of America. p.304
- Willaert, R. (2006). The Beer Brewing Process: Wort Production and Beer Fermentation, in: Hui, Y.H. (Ed.), *Handbook of Food Products Manufacturing*. John Wiley & Sons, inc., Brussel. p.443–506.
- Willaert, R. (2012). *Biochemistry of Beer Fermentation*. *Food Biochemistry and Food Processing: Second Edition*. p.627–653.
- Wiley, J.M.; Sherwood, L.M.; Woolverton, C.J. (2008). Prescott, Harley and Klein's *Microbiology* 7ª edição. Microbial Growth - The continuous culture of microorganisms. Higher Education. p. 131.

6. Cibergrafia

Aroxa (2016). Certified beer flavour standards. Consultado a: 01/01/2018. Disponível em: <https://www.aroxa.com/beer/beer-flavour-standard/where/p/4>.

APPC. Associação Portuguesa dos Produtores de cerveja (2012). A história da cerveja - Em Portugal. Consultado a: 27/08/2017. Disponível em: <http://www.apcv.pt/pdfs/4.Portugal.pdf>.

Brewer's Friend (2013). Beer Priming Calculator. Consultado a: 20/05/2017. Disponível em: <http://www.brewersfriend.com/beer-priming-calculator/>.

Cerveja Artesanal Portuguesa (2017). Lista de Cervejas Artesanais de Portugal. Consultado a: 18/01/2018. Disponível em: <http://cervejaartesanalportuguesa.pt/cervejas/>

German Brewers' Association (2017). The Reinheitsgebot as a Guarantee of Quality. Consultado a: 24/10/2017. Disponível em: <http://reinheitsgebot.de/en/home/the-reinheitsgebot/>.

Siebel Institute of Technology (2017). Sensorial Training Kit. Consultado a: 28/12/2017. Disponível em: <https://www.siebelinstitute.com>

Viticulture & Enology (2017). Yeast and molds - Metschnikowia pulcherrima. Consultado a: 11/15/2017. Disponível em: http://wineserver.ucdavis.edu/industry/enology/winemicro/wineyeast/metschnikowia_pulcherrima.html.

7. Anexos

Anexo I - Receita-base e programa de brassagem

Tabela 23 - Receita e programa de brassagem do mosto *Stout*.

Receita-base		Programa de brassagem		
Malte(s)	Quantidade (g)	Tempo (min)		Temperatura (°C)
Pale Ale (5,9 EBC)	4000	15		45
Black (985 EBC)	200	20		60
Roasted (1000 EBC)	200	40		70
Caramel (118,2 EBC)	150	10		75
Oat Flakes (2,0 EBC)	300			
		Fase Ebulição		
Lúpulo(s)	Quantidade (g)	Lúpulo(s)	Quantidade (g)	Tempo (min)
Northern Brewer	30	Northern Brewer	30	60

Tabela 24 - Receita e programa de brassagem do mosto *Dunkel*

Receita-base		Programa de brassagem		
Malte(s)	Quantidade (g)	Tempo (min)		Temperatura (°C)
Pale Ale (5,9 EBC)	2000	15		45
Munich (17,7 EBC)	1400	15		55
Crystal (160 EBC)	450	45		68
Crystal (50 EBC)	225	10		75
Chocolat (900 EBC)	110			
		Fase Ebulição		
Lúpulo(s)	Quantidade (g)	Lúpulo(s)	Quantidade (g)	Tempo (min)
Hallertauer	65	Hallertauer	20	30
Hersbrucker		Hersbrucker	35	60

Tabela 25 - Receita e programa de brassagem do mosto *Weissbier*

Receita-base		Programa de brassagem		
Malte(s)	Quantidade (g)	Tempo (min)		Temperatura (°C)
Wheat Malt	2520	15		45
Pilsner	1420	15		54
Cara-Pils	1030	45		63
		Fase Ebulição		
Lúpulo(s)	Quantidade (g)	Lúpulo(s)	Quantidade (g)	Tempo (min)
Hallertauer Hersbrucker	65	Hallertauer Hersbrucker	7	60
Hallertauer Perle	0,1	Hallertauer Perle	7	60
		Hallertauer Hersbrucker	5	0

Anexo II – Retas de calibração de HPCL

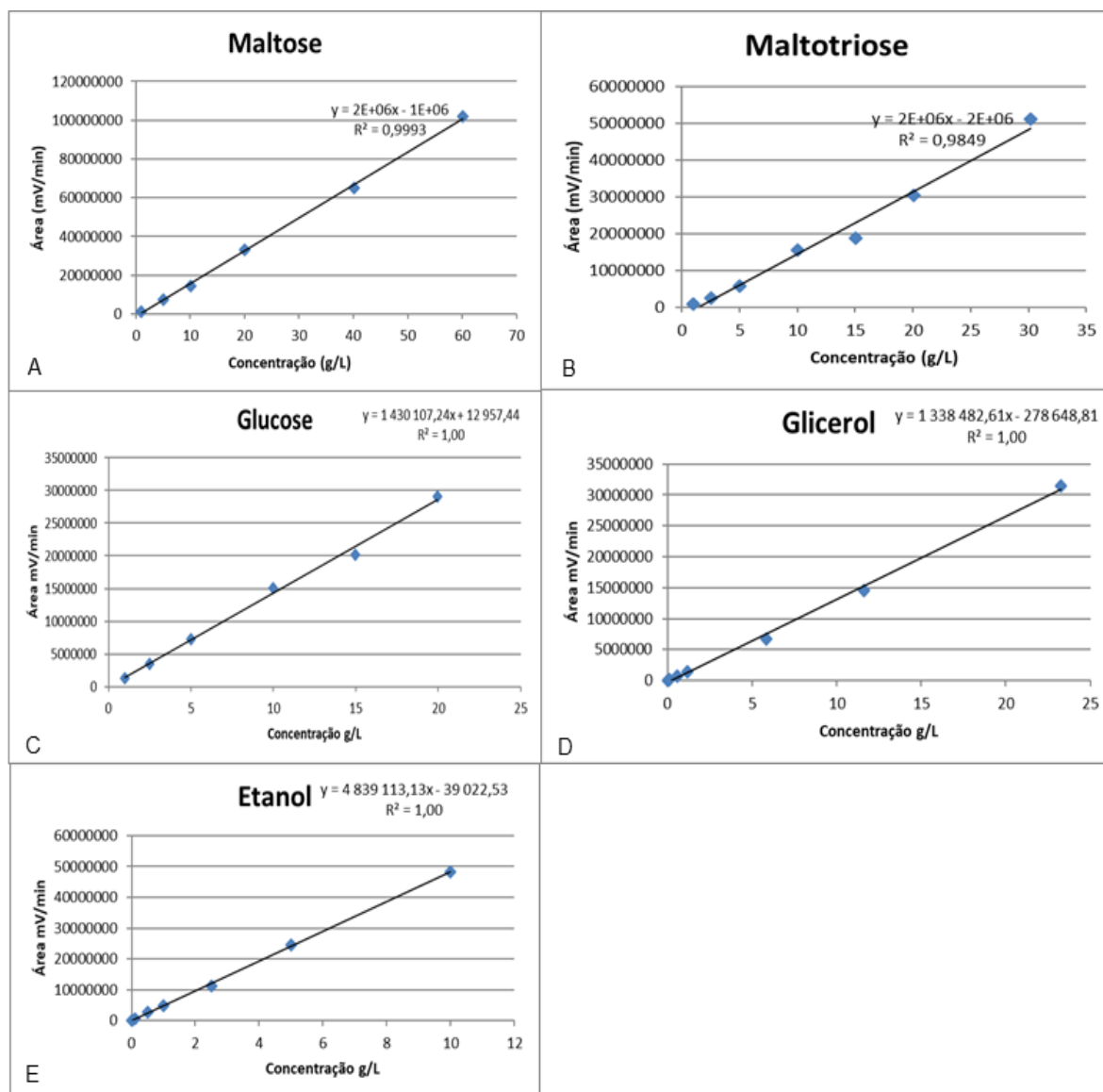


Figura 45 - Curvas de calibração de HPLC, dos diferentes açúcares - maltose (A), maltotriose (B) e glucose (C), assim como do glicerol (D) e do etanol (E).

Anexo III – Ficha de prova de análise sensorial

0 -Não gosta nada; 1- gosta pouco; 2- gosta ligeiramente; 3- gosta moderadamente; 4- gosta muito; 5- gosta muitíssimo

Aparência			
	<i>Stout</i>	<i>Dunkel</i>	<i>Weissbier</i>
<i>Blanche</i>			
S23			
S0-4			
1441			
1808			
1886			

Aroma			
	<i>Stout</i>	<i>Dunkel</i>	<i>Weissbier</i>
<i>Blanche</i>			
S23			
S0-4			
1441			
1808			
1886			

Palato			
	<i>Stout</i>	<i>Dunkel</i>	<i>Weissbier</i>
<i>Blanche</i>			
S23			
S0-4			
1441			
1808			
1886			

Flavour			
	<i>Stout</i>	<i>Dunkel</i>	<i>Weissbier</i>
<i>Blanche</i>			
S23			
S0-4			
1441			
1808			
1886			

Drinkability			
	<i>Stout</i>	<i>Dunkel</i>	<i>Weissbier</i>
<i>Blanche</i>			
S23			
S0-4			
1441			
1808			
1886			

Adequado ao estilo de cerveja			
	<i>Stout</i>	<i>Dunkel</i>	Weiss
<i>Blanche</i>			
S23			
S0-4			
1441			
1808			
1886			

Classificação geral : 0 a 10			
	<i>Stout</i>	<i>Dunkel</i>	Weiss
<i>Blanche</i>			
S23			
S0-4			
1441			
1808			
1886			

Anexo IV –Tabelas resumo dos resultados obtidos nos ensaios parâmetros em avaliação.

Tabela 26 - Resumo dos resultados obtidos no início da fermentação

Viabilidade	Nº Células totais (UFC/mL)			Nº Células Viáveis (UFC/mL)			Nº Células Cultiváveis (UFC/mL)			Viabilidade Relativa (%)		
Mosto	<i>Dunkel</i>	<i>Weiss</i>	<i>Stout</i>	<i>Dunkel</i>	<i>Weiss</i>	<i>Stout</i>	<i>Dunkel</i>	<i>Weiss</i>	<i>Stout</i>	<i>Dunkel</i>	<i>Weiss</i>	<i>Stout</i>
E. comercial	$1,45 \times 10^7$	$1,05 \times 10^6$	$1,90 \times 10^6$	$1,45 \times 10^7$	$8,15 \times 10^5$	$1,90 \times 10^6$	$5,00 \times 10^5$	$3,50 \times 10^5$	$3,00 \times 10^5$	100	78	100
<i>P. kluyveri</i>	$2,15 \times 10^7$	$1,01 \times 10^7$	$9,20 \times 10^6$	$2,14 \times 10^7$	$8,97 \times 10^6$	$9,20 \times 10^6$	$1,65 \times 10^6$	$3,50 \times 10^5$	$1,50 \times 10^6$	100	89	100
<i>M. pulcherrima</i>	$1,15 \times 10^7$	$3,11 \times 10^6$	$3,50 \times 10^6$	$1,14 \times 10^7$	$2,47 \times 10^6$	$2,90 \times 10^6$	$3,50 \times 10^5$	$3,75 \times 10^5$	$1,40 \times 10^7$	99	80	83
<i>S. ludwigii</i>	$7,35 \times 10^6$	$4,29 \times 10^6$	$6,00 \times 10^5$	$7,20 \times 10^6$	$4,15 \times 10^6$	$6,00 \times 10^5$	$2,50 \times 10^5$	$1,25 \times 10^5$	$1,25 \times 10^5$	98	97	80

	Turvação (Abs. 640nm)			Proteína solúvel (mg/L)			pH			°Brix			Densidade (mg/mL)		
Mosto	<i>Dunkel</i>	<i>Weiss</i>	<i>Stout</i>	<i>Dunkel</i>	<i>Weiss</i>	<i>Stout</i>	<i>Dunkel</i>	<i>Weiss</i>	<i>Stout</i>	<i>Dunkel</i>	<i>Weiss</i>	<i>Stout</i>	<i>Dunkel</i>	<i>Weiss</i>	<i>Stout</i>
E. comercial	0,34 ± 0,03	1,42 ± 0,00	0,90 ± 0,01	249,01 ± 0,02	315,83 ± 2,46	118,59 ± 0,00	5,02 ± 0,02	5,33 ± 0,00	5,02 ± 0,04	10,48 ± 0,30	13,45 ± 1,10	7,25 ± 0,85	1,00 ± 0,03	1,050 ± 0,00	1,021 ± 0,02
<i>P. kluyveri</i>	0,39 ± 0,00	1,42 ± 0,00	0,85 ± 0,39	249,01 ± 0,01	315,83 ± 1,71	118,59 ± 0,00	5,05 ± 0,00	5,28 ± 0,25	5,03 ± 0,03	10,55 ± 0,25	13,45 ± 0,20	7,38 ± 0,00	1,002 ± 0,01	1,048 ± 0,02	1,022 ± 0,01
<i>M. pulcherrima</i>	0,37 ± 0,00	1,42 ± 0,00	0,90 ± 0,25	249,01 ± 0,00	315,83 ± 0,30	118,59 ± 0,00	5,10 ± 0,00	5,35 ± 0,28	5,05 ± 0,04	10,48 ± 0,35	13,45 ± 1,15	7,50 ± 0,00	1,000 ± 0,01	1,047 ± 0,02	1,019 ± 0,02
<i>S. ludwigii</i>	0,38 ± 0,00	1,42 ± 0,05	0,94 ± 0,00	249,01 ± 0,02	315,83 ± 0,00	118,59 ± 0,00	5,00 ± 0,02	5,63 ± 0,00	5,05 ± 0,04	10,40 ± 0,60	13,45 ± 2,90	7,38 ± 0,00	0,998 ± 0,02	1,049 ± 0,01	1,021 ± 0,01

% (m/v)	Maltotriose			Maltose			Glucose			Glicerol			Etanol		
Mosto	<i>Dunkel</i>	<i>Weiss</i>	<i>Stout</i>	<i>Dunkel</i>	<i>Weiss</i>	<i>Stout</i>	<i>Dunkel</i>	<i>Weiss</i>	<i>Stout</i>	<i>Dunkel</i>	<i>Weiss</i>	<i>Stout</i>	<i>Dunkel</i>	<i>Weiss</i>	<i>Stout</i>
E. comercial	4,11	2,52	1,67	11,63	7,31	1,74	1,74	1,63	4,17	0,00	0,32	0,30	0,71	0,03	0,03
<i>P. kluyveri</i>	4,11	2,65	1,67	11,63	7,29	1,74	1,74	1,62	4,17	0,00	0,32	0,30	0,71	0,03	0,03
<i>M. pulcherrima</i>	4,11	2,52	1,67	11,63	7,33	1,74	1,74	1,52	4,17	0,00	0,32	0,30	0,89	0,02	0,03
<i>S. ludwigii</i>	4,11	2,69	1,67	11,63	7,05	1,74	1,74	1,78	4,17	0,00	0,32	0,30	0,71	0,00	0,03

Tabela 27 - Resumo dos resultados obtidos no momento da co-inoculação

Viabilidade	Nº Células totais (UFC/mL)			Nº Células Viáveis (UFC/mL)			Nº Células Cultiváveis (UFC/mL)			Viabilidade Relativa (%)		
Mosto	<i>Dunkel</i>	<i>Weiss</i>	<i>Stout</i>	<i>Dunkel</i>	<i>Weiss</i>	<i>Stout</i>	<i>Dunkel</i>	<i>Weiss</i>	<i>Stout</i>	<i>Dunkel</i>	<i>Weiss</i>	<i>Stout</i>
E. comercial	$1,17 \times 10^7$	$6,29 \times 10^5$	$2,77 \times 10^7$	$1,17 \times 10^7$	$5,08 \times 10^5$	$2,77 \times 10^7$	$2,43 \times 10^6$	$7,43 \times 10^6$	$7,50 \times 10^7$	100	81	100
<i>P. kluyveri</i>	$5,11 \times 10^7$	$1,61 \times 10^6$	$2,00 \times 10^6$	$5,10 \times 10^7$	$4,30 \times 10^7$	$1,90 \times 10^6$	$8,80 \times 10^6$	$2,50 \times 10^4$	$9,58 \times 10^8$	100	27	95
<i>M. pulcherrima</i>	$1,20 \times 10^6$	$1,92 \times 10^7$	$6,00 \times 10^5$	$1,20 \times 10^6$	$1,28 \times 10^5$	$6,00 \times 10^5$	$6,15 \times 10^6$	$9,00 \times 10^5$	$5,50 \times 10^7$	100	67	100
<i>S. ludwigii</i>	$7,73 \times 10^6$	$1,98 \times 10^7$	$9,00 \times 10^5$	$7,10 \times 10^6$	$1,38 \times 10^7$	$9,00 \times 10^5$	$2,00 \times 10^6$	$2,98 \times 10^6$	$1,63 \times 10^8$	92	70	100

	Turvação (Abs. 640nm)			Proteína solúvel (mg/L)			pH			°Brix			Densidade (mg/mL)		
Mosto	<i>Dunkel</i>	<i>Weiss</i>	<i>Stout</i>	<i>Dunkel</i>	<i>Weiss</i>	<i>Stout</i>	<i>Dunkel</i>	<i>Weiss</i>	<i>Stout</i>	<i>Dunkel</i>	<i>Weiss</i>	<i>Stout</i>	<i>Dunkel</i>	<i>Weiss</i>	<i>Stout</i>
E. comercial	0,21 ± 0,02	0,60 ± 0,37	0,81 ± 0,35	249,18 ± 0,00	315,25 ± 0,00	121,06 ± 9,86	3,97 ± 0,01	4,31 ± 0,14	3,98 ± 0,03	4,70 ± 0,10	6,20 ± 1,00	8,15 ± 0,55	0,979 ± 0,03	1,003 ± 0,03	1,003 ± 0,00
<i>P. kluyveri</i>	0,79 ± 0,17	0,35 ± 0,00	0,52 ± 0,24	247,07 ± 0,00	326,669 ± 0,74	122,46 ± 0,00	4,67 ± 0,04	5,03 ± 0,01	4,17 ± 0,12	6,25 ± 0,15	11,50 ± 0,10	9,15 ± 0,05	0,981 ± 0,02	1,004 ± 0,03	1,000 ± 0,01
<i>M. pulcherrima</i>	0,53 ± 0,01	0,79 ± 0,00	0,30 ± 0,01	198,83 ± 0,00	331,97 ± 1,02	68,24 ± 0,00	4,53 ± 0,01	4,82 ± 0,29	4,08 ± 0,23	4,85 ± 0,25	12,90 ± 1,40	6,35 ± 0,00	0,974 ± 0,02	1,033 ± 0,01	1,007 ± 0,02
<i>S. ludwigii</i>	0,41 ± 0,00	0,81 ± 0,46	0,38 ± 0,03	246,01 ± 0,00	358,38 ± 2,06	94,30 ± 0,35	4,73 ± 0,01	4,99 ± 0,18	4,19 ± 0,17	9,00 ± 0,10	13,85 ± 2,35	6,15 ± 0,35	0,970 ± 0,02	1,035 ± 0,01	1,002 ± 0,01

% (m/v)	Maltotriose			Maltose			Glucose			Glicerol			Etanol		
Mosto	<i>Dunkel</i>	<i>Weiss</i>	<i>Stout</i>	<i>Dunkel</i>	<i>Weiss</i>	<i>Stout</i>	<i>Dunkel</i>	<i>Weiss</i>	<i>Stout</i>	<i>Dunkel</i>	<i>Weiss</i>	<i>Stout</i>	<i>Dunkel</i>	<i>Weiss</i>	<i>Stout</i>
E. comercial	0,00	1,84	1,73	3,13	0,88	1,31	0,00	0,00	0,52	0,35	0,44	0,45	2,37	0,49	0,33
<i>P. kluyveri</i>	2,34	2,21	1,47	5,21	5,73	1,36	0,58	0,15	1,71	0,19	0,37	0,35	0,62	0,07	0,49
<i>M. pulcherrima</i>	1,23	2,21	1,31	7,76	5,53	1,10	0,00	0,40	2,87	0,35	0,43	0,31	0,79	0,07	0,09
<i>S. ludwigii</i>	0,00	2,42	1,01	2,26	6,38	1,14	0,11	0,00	0,11	0,42	0,38	0,21	0,62	0,13	0,40

Tabela 28 - Resumo dos resultados obtidos no momento final da fermentação da co-inoculação

Viabilidade	Nº Células totais (UFC/mL)			Nº Células Viáveis (UFC/mL)			Nº Células Cultiváveis (UFC/mL)			Viabilidade Relativa (%)		
Mosto	<i>Dunkel</i>	<i>Weiss</i>	<i>Stout</i>	<i>Dunkel</i>	<i>Weiss</i>	<i>Stout</i>	<i>Dunkel</i>	<i>Weiss</i>	<i>Stout</i>	<i>Dunkel</i>	<i>Weiss</i>	<i>Stout</i>
E. comercial	$4,70 \times 10^6$	$1,49 \times 10^7$	$3,64 \times 10^7$	$4,65 \times 10^6$	$9,40 \times 10^6$	$2,44 \times 10^7$	$2,50 \times 10^6$	$7,50 \times 10^6$	$4,63 \times 10^8$	99	78	67
<i>P. kluyveri</i>	$1,17 \times 10^7$	$4,40 \times 10^5$	$3,52 \times 10^7$	$1,10 \times 10^7$	$3,65 \times 10^5$	$2,96 \times 10^7$	$2,42 \times 10^8$	$5,75 \times 10^8$	$4,63 \times 10^8$	94	83	84
<i>M. pulcherrima</i>	$3,70 \times 10^7$	$4,80 \times 10^5$	$1,78 \times 10^7$	$3,70 \times 10^7$	$3,65 \times 10^5$	$1,52 \times 10^7$	$4,70 \times 10^8$	$3,00 \times 10^7$	$5,83 \times 10^8$	100	88	85
<i>S. ludwigii</i>	$2,99 \times 10^7$	$1,11 \times 10^6$	$2,32 \times 10^7$	$2,99 \times 10^7$	$6,90 \times 10^5$	$1,86 \times 10^7$	$5,50 \times 10^7$	$9,65 \times 10^8$	$8,23 \times 10^8$	100	62	80

	Turvação (Abs. 640nm)			Proteína solúvel (mg/L)			pH			°Brix			Densidade (mg/mL)		
Mosto	<i>Dunkel</i>	<i>Weiss</i>	<i>Stout</i>	<i>Dunkel</i>	<i>Weiss</i>	<i>Stout</i>	<i>Dunkel</i>	<i>Weiss</i>	<i>Stout</i>	<i>Dunkel</i>	<i>Weiss</i>	<i>Stout</i>	<i>Dunkel</i>	<i>Weiss</i>	<i>Stout</i>
E. comercial	0,39 ± 0,000	1,45 ± 0,000	0,89 ± 0,160	215,65 ± 0,00	311,37 ± 0,00	109,26 ± 6,87	4,26 ± 0,03	4,40 ± 0,15	4,49 ± 0,04	5,00 ± 0,30	5,90 ± 0,80	6,85 ± 1,65	0,996 ± 0,01	0,984 ± 0,01	0,995 ± 0,03
<i>P. kluyveri</i>	1,03 ± 0,000	1,02 ± 0,000	0,63 ± 0,170	246,19 ± 0,02	250,99 ± 0,00	67,89 ± 13,03	4,32 ± 0,02	4,32 ± 0,04	4,39 ± 0,08	6,05 ± 0,15	7,00 ± 0,20	5,20 ± 1,00	0,993 ± 0,01	0,968 ± 0,03	1,004 ± 0,01
<i>M. pulcherrima</i>	0,83 ± 0,000	1,41 ± 0,000	0,39 ± 0,100	188,09 ± 0,02	325,81 ± 0,58	128,00 ± 13,03	4,17 ± 0,00	4,20 ± 0,12	4,21 ± 0,03	4,70 ± 0,20	7,35 ± 0,45	7,40 ± 0,00	0,988 ± 0,01	0,960 ± 0,04	0,997 ± 0,01
<i>S. ludwigii</i>	1,10 ± 0,000	0,46 ± 0,000	0,40 ± 0,000	245,13 ± 0,00	336,20 ± 0,00	98,87 ± 0,00	4,45 ± 0,01	4,60 ± 0,05	4,25 ± 0,06	8,65 ± 0,05	8,80 ± 1,90	6,35 ± 0,656	1,010 ± 0,00	0,984 ± 0,01	1,006 ± 0,01

% (m/v)	Maltotriose			Maltose			Glucose			Glicerol			Etanol		
Mosto	<i>Dunkel</i>	<i>Weiss</i>	<i>Stout</i>	<i>Dunkel</i>	<i>Weiss</i>	<i>Stout</i>	<i>Dunkel</i>	<i>Weiss</i>	<i>Stout</i>	<i>Dunkel</i>	<i>Weiss</i>	<i>Stout</i>	<i>Dunkel</i>	<i>Weiss</i>	<i>Stout</i>
E. comercial	0,00	0,92	0,64	0,00	0,00	0,93	0,00	0,00	0,00	0,86	0,41	0,42	3,57	0,53	0,54
<i>P. k</i>	0,00	0,92	0,78	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,97	1,23	0,30	2,87	1,81	0,66
<i>M. p</i>	0,00	1,14	1,08	0,00	0,00	0,37	0,00	0,00	0,00	0,74	0,47	0,24	3,19	0,48	0,55
<i>S. l</i>	0,00	0,92	0,12	0,00	0,00	0,30	0,00	0,00	0,00	0,67	0,96	0,22	4,59	2,04	0,48

Tabela 29 - Resumo dos resultados obtidos no produto final.

	Turvação (Abs. 640nm)			Proteína solúvel (mg/L)			pH			°Brix			Densidade (mg/mL)		
Mosto	<i>Dunkel</i>	<i>Weiss</i>	<i>Stout</i>	<i>Dunkel</i>	<i>Weiss</i>	<i>Stout</i>	<i>Dunkel</i>	<i>Weiss</i>	<i>Stout</i>	<i>Dunkel</i>	<i>Weiss</i>	<i>Stout</i>	<i>Dunkel</i>	<i>Weiss</i>	<i>Stout</i>
E. comercial	0,25 ± 0,054	0,12 ± 0,046	0,47 ± 0,030	243,60 ± 3,52	177,04 ± 0,00	228,45 ± 17,96	3,980 ± 0,03	4,305 ± 0,11	4,285 ± 0,06	5,20 ± 0,30	5,88 ± 0,58	6,35 ± 0,05	0,903 ± 0,03	0,924 ± 0,03	0,977 ± 0,01
<i>P. k</i>	0,49 ± 0,143	0,21 ± 0,108	0,54 ± 0,078	243,94 ± 15,49	205,65 ± 0,00	221,06 ± 27,11	4,145 ± 0,05	4,135 ± 0,16	4,240 ± 0,03	5,88 ± 0,13	6,95 ± 0,05	4,90 ± 0,00	0,902 ± 0,03	0,917 ± 0,06	0,956 ± 0,02
<i>M. p</i>	0,64 ± 0,000	0,58 ± 0,266	0,47 ± 0,020	214,01 ± 15,85	175,28 ± 0,00	186,55 ± 7,75	4,005 ± 0,01	4,300 ± 0,04	4,065 ± 0,11	4,90 ± 0,30	6,85 ± 0,05	5,95 ± 0,00	0,964 ± 0,01	0,933 ± 0,04	0,883 ± 0,04
<i>S. l</i>	0,46 ± 0,018	0,32 ± 0,027	0,39 ± 0,031	265,42 ± 1,76	198,87 ± 0,00	233,03 ± 27,82	4,310 ± 0,02	4,465 ± 0,01	4,110 ± 0,02	4,80 ± 0,00	7,10 ± 0,00	4,50 ± 0,00	0,934 ± 0,04	0,937 ± 0,04	0,973 ± 0,01

% (m/v)	Glicerol			Etanol		
Mosto	<i>Dunkel</i>	<i>Weiss</i>	<i>Stout</i>	<i>Dunkel</i>	<i>Weiss</i>	<i>Stout</i>
E. comercial	0,69	1,27	1,70	0,97	1,78	2,10
<i>P. k</i>	1,43	1,54	0,90	2,26	2,02	1,60
<i>M. p</i>	1,22	1,56	0,40	1,78	2,73	0,70
<i>S. l</i>	0,91	1,04	0,70	1,32	1,66	0,70

